

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE

STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



LIBUŠE NOSKOVÁ

**Studium adheze *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního
epitelu**

**Study of the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to lung
epithelial cells**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Libuše Nosková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a připomínky při jejím vypracovávání. Dále děkuji MUDr. Zoře Mělkové, Ph.D. za umožnění měření na průtokovém cytometru a všestrannou pomoc s touto metodou.

Abstrakt

Pseudomonas aeruginosa je oportunní lidský patogen, který se běžně vyskytuje v přírodě. Patogeneze *P. aeruginosa* je vázána zejména na cystickou fibrosu, kde právě infekce plic tímto mikroorganismem je nejčastější příčinou smrti pacientů. Cystická fibrosa je geneticky podmíněné onemocnění nesoucí sebou řadu zdravotních komplikací a omezení. Hlavní komplikací je chronická kolonizace a infekce dýchacích cest pacientů specifickými mikroorganismy – *P. aeruginosa*, *B. cepacia* komplex. Ke kolonizaci dýchacích cest dochází prostřednictvím řady adhezivních struktur jako je například lektin PA-IIL. V současné době je nejpoužívanější terapií léčba antibiotiky, ale vzhledem ke vzniku rezistencí jsou hledány i jiné způsoby léčby. Jednou ze studovaných možností je pasivní imunizace pacientů pomocí slepičích protilátek. Pro tento účel byly připraveny protilátky proti jedné z adhezivních struktur *P. aeruginosa*, proti rekombinantnímu lektinu PA-IIL. Schopnost protilátek zabránit adhezi bakterií na buňky plicní tkáně byla studována *in vitro* v modelovém systému buněk plicní tkáně a *P. aeruginosa*. Používány byly stabilní buněčné linie A549, NuLi-1, CuFi-1. K vyhodnocení adhezních testů, jejichž postup byl optimalizován, byl hledán vhodný objektivní způsob vyhodnocení založený na kvantifikaci fluorescence epiteliálních buněk a *P. aeruginosa*. Využito bylo fluorescenčního značení bakterií *Pseudomonas aeruginosa* pomocí PKH 26 poskytující fluorescenci v oranžovo-červené oblasti spektra a značení plicních buněk pomocí PKH 67, který poskytuje fluorescenci v zelené oblasti spektra. Srovnána byla metoda průtokové cytometrie a spektrofluorimetrie, kdy druhá jmenovaná více vyhovuje používanému *in vitro* modelovému systému. V tomto modelovém systému bylo pomocí spektrofluorimetrie zjištěno, že slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL je prokazatelně schopna bránit adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně. Množství bakterií na plicních buňkách po ošetření protilátkou kleslo přibližně o 35% oproti neošetřené kontrole, v případě linie CuFi-1 pak o více než 50%.

Klíčová slova: cystická fibrosa, buňky plicní tkáně, *Pseudomonas aeruginosa*, adhezní testy, fluorescenční značení, spektrofluorimetrie, průtoková cytometrie, slepičí protilátky

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that is commonly found in nature. Pathogenesis of *P. aeruginosa* is related especially to cystic fibrosis, where the lung infection with this microorganism is a leading cause of death of patients. Major complication is chronic colonization and infection of the patients airway by specific microorganisms – *P. aeruginosa*, *B. cepacia* complex. The colonization of respiratory tract is mediated by the series of adhesive structures such as lectin PA-IIL. Currently, the most widely used therapy is an antibiotic treatment. Due to the increasing resistance to antibiotics another methods for treatment are being searched. One possibility is a passive immunization of patients with chicken antibodies. For this purpose, we prepared antibodies against one of the adhesive structures of *P. aeruginosa* – recombinant lectin PA-IIL. The ability of antibodies to prevent the adhesion of bacteria to the human lung cells was studied in an *in vitro* model system based on human lung cells and *P. aeruginosa*. We used stable cell lines A549, NuLi-1, CuFi-1. The process of adhesion tests was optimized. To evaluate the adhesion tests we searched for an appropriate objective evaluation method based on the quantification of fluorescence of the components of the model system. We used fluorescent staining of bacteria *P. aeruginosa* by the PKH 26 providing the orange-red fluorescence and labeling of the human lung cells by PKH 67 which gives a green fluorescence. Flow cytometry and spectrofluorimetry were compared. Spectrofluorimetry was found more suitable for this *in vitro* model system. In this model system was found, using spectrofluorimetry, that chicken antibody against the bacterial lectin PA-IIL is clearly able to prevent the adhesion of *P. aeruginosa* to human lung cells. Amount of bacteria on the lung cells after antibody treatment decreased by approximately 35 % compared to untreated control, in case of the CuFi-1 line then more than 50 %.

Key words: cystic fibrosis, human lung cells, *Pseudomonas aeruginosa*, adhesive tests, fluorescent labeling, spectrofluorimetry, flow cytometry, chicken antibodies

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
1 Úvod	5
1.1 Cystická fibróza	5
♦ 1.1.1 Charakteristika onemocnění	6
♦ 1.1.2 Příznaky a diagnosa onemocnění	8
♦ 1.1.3 Terapie	13
1.2 Respirační systém	16
♦ 1.2.1 Plicní systém pacientů s CF	17
♦ 1.2.2 Buňky plicního systému	19
1.3 Imunitní systém	20
♦ 1.3.1 Imunitní systém u CF pacientů	21
♦ 1.3.2 Slepíci protilátky jako možnost terapie	22
1.4 Mikroorganismy vázané na CF	24
♦ 1.4.1 Pseudomonas aeruginosa	24
♦ 1.4.2 Lektiny Pseudomonas aeruginosa	27
♦ 1.4.3 Burkholderia cepacia komplex	28
♦ 1.4.4 Lektiny Burkholderia cepacia	30
♦ 1.4.5 Další mikroorganismy	31
2 Cíl práce	32
3 Materiál a metody	33
3.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení	33
♦ 3.1.1 Přístrojové vybavení	33
♦ 3.1.2 Použitý materiál	34
3.2 Techniky tkáňových kultur	36
♦ 3.2.1 Rozmražení linií	36
♦ 3.2.2 Kultivace linií	37
♦ 3.2.3 Subkultivace buněk	39
♦ 3.2.4 Kryokonzervace linií	40
♦ 3.2.5 Stanovení počtu buněk	40
♦ 3.2.6 Příprava kultivačních nádob s kolagenem	41
3.3 Izolace buněk dýchacích cest metodou „brushing“	41
3.4 Práce s Pseudomonas aeruginosa	42
♦ 3.4.1 Kultivace Pseudomonas aeruginosa	42

3.5 Fluorescenční značení buněk.....	43
♦ 3.5.1 Značení bakterií pomocí PKH 26.....	44
♦ 3.5.2 Značení plicních buněk pomocí PKH 67.....	44
♦ 3.5.3 Značení plicních buněk pomocí CellTracker.....	45
3.6 Interakce buněk plicní tkáně s bakteriemi.....	46
♦ 3.6.1 Adhezní test.....	46
♦ 3.6.2 Adhezní test s využitím průtokové cytometrie.....	48
4 Výsledky.....	50
4.1 Fluorescenční značení <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
4.2 Fluorescenční značení buněk plicního epitelu.....	53
♦ 4.2.1 Fluorescenční značení pomocí CellTracker Green CMFDA.....	53
♦ 4.2.2 Fluorescenční značení A549 pomocí PKH 67.....	53
♦ 4.2.3 Fluorescenční značení NuLi-1 a CuFi-1 pomocí PKH 67.....	56
4.3 Optimalizace adhezních testů.....	59
4.4 Interakce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s buňkami plicní tkáně.....	60
♦ 4.4.1 Interakce <i>P. aeruginosa</i> s linií A549.....	60
♦ 4.4.2 Interakce <i>P. aeruginosa</i> s liniemi NuLi-1 a CuFi-1.....	64
♦ 4.4.3 Srovnání linií NuLi-1 a CuFi-1.....	72
4.5 Průtoková cytometrie.....	74
♦ 4.5.1 Stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
♦ 4.5.2 Optimalizace měření adhezního testu s využitím linie A549.....	76
♦ 4.5.3 Interakce buněk plicní tkáně s <i>P. aeruginosa</i>	81
5 Diskuse	86
6 Shrnutí.....	92
7 Seznam použité literatury.....	93
Přílohy.....	97
♦ Příloha 1 Produktové listy linií NuLi-1 a CuFi-1.....	97

Seznam použitých zkratk

ATP	Adenosintrifosfát
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
BEGM	Bronchial epithelial cell growth medium
bp	páry bazí v DNA („Base pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator“
CFU	vyjádření koncentrace bakterií - „colony forming units“
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS / FCS	fetální telecí sérum („fetal bovine / calf serum“)
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FN	fakultní nemocnice
FSC	Forward scatter, parametr průtokové cytometrie
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
Glc	glukosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
h	hodina
HLA	„Human leukocyte antigen“
Hu	označení vzorků od pacientů („human“ - lidský)
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin Y (analogický s třídou G, vyskytuje se u ptáků)
IL-1 (-6,8,10,..)	interleukiny, chemokiny
kDa	kilo- Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
MBL	mannosu vázající lektin („mannose binding lectin“)
Neu5Ac	kyselina sialová (neuraminová)
NF-κB	nukleární faktor κB, transkripční faktor

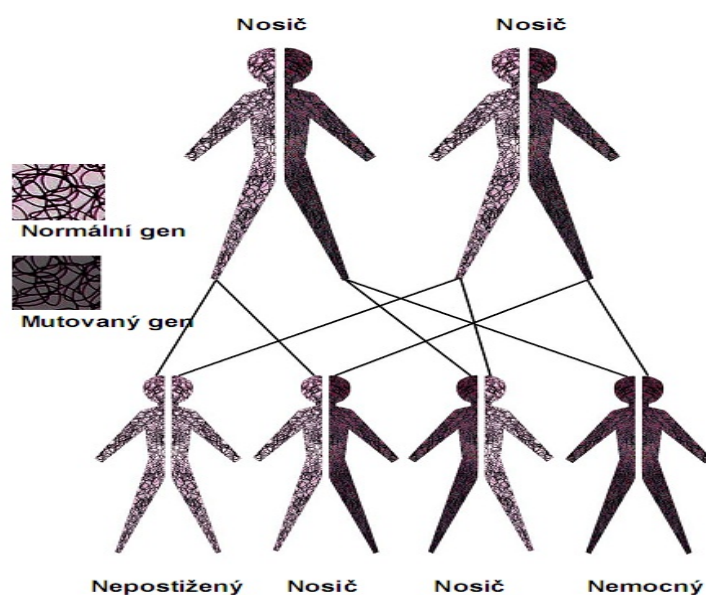
P	označení vybrané populace buněk u průtokové cytometrie
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
RPM	počet otáček za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecyl sulfát sodný
SP -A (D)	surfaktantový protein A (D)
SSC	Side scatter, parametr průtokové cytometrie
TB	trypanová modř („trypan blue“)
TBS	„TRIS buffered saline“
Th	pomocný T lymfocyt („helper T cell“)
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	volt, jednotka napětí

1 Úvod

Pseudomonas aeruginosa je oportunní lidský patogen, který hraje významnou roli v progresi plicního poškození u pacientů s cystickou fibrosou. Pacienti s CF jsou ohrožováni častými mikrobiálními infekcemi plic a některé patogeny jako je *P. aeruginosa* způsobují infekce chronické, což může vést až k život ohrožujícím komplikacím. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá studiem adheze *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu a možnostmi ovlivnění této adheze, zejména pomocí protilátek.

1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza je genetické onemocnění. Je uváděn výskyt jednoho nemocného dítěte na 2500 – 4500 novorozenců [1]. Jedná se o recesivně autozomálně dědičné onemocnění. Platí zde Mendelovy zákony dědičnosti – pokud jsou oba rodiče zdraví nositelé mutace v příslušném genu (heterozygoti), v potomstvu se pak bude vyskytovat 50% zdravých nositelů mutace, 25% zdravých jedinců bez mutace a 25% nemocných jedinců (obr. 1.1 [2]).



Obr. 1.1: Schéma dědičnosti genu pro CFTR. [2]

Molekulární podstatou onemocnění je mutace genu CFTR, který kóduje stejnojmenný protein (CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane-conductance Regulator) [1]. Popsáno bylo zatím asi 1700 mutací, nicméně tzv. „panevropská“ mutace se vyskutekuje u zhruba 66-70% pacientů s CF a jedná se o mutaci označovanou jako F508del. Z toho dalších 8 mutací má četnost alespoň 1% (např. G551D, G542X). Většina nalezených mutací nezpůsobuje manifestní onemocnění, protože některé z nich jsou lokalizovány v nekódujících oblastech genu, v intronech. Typické varianty CF bývají diagnostikovány časně v dětském věku a jsou spojeny s pankreatickou nedostatečností. Obvykle bývá touto nemocí postiženo vedle dýchacího i trávicího ústrojí, v některých případech pak i reprodukční. Nejvíce komplikací je však vázaných na respirační systém [3].

1.1.1 Charakteristika onemocnění

Jedná se o geneticky podmíněné onemocnění, kdy mutace v genu CFTR má za následek snížení, případně úplnou ztrátu funkce CFTR proteinu. Míra a závažnost zdravotních komplikací závisí mimo jiné i na typu mutace CFTR [4].

CFTR

Gen pro protein CFTR se nachází na chromosomu 7, skládá se ze 27 exonů a kóduje protein o 1480 aminokyselinových zbytcích. Byla popsána celá řada mutací v tomto genu. Největší procento nositelů má stejnou mutaci F508del. Tato mutace znamená delecii 3bp, která vede k vyřazení fenylalaninu v pozici 508 proteinu [5]. Dle alterací příslušného proteinu lze mutace rozdělit do 6 tříd [6]:

1. třída - neprobíhá žádná syntéza proteinu, příčinou je „nekódující“ (nonsense) mutace nebo předčasné zařazení stop kodonu; nalezeny asi na 5% CF chromozomů; př. W1282X
2. třída - je ovlivněna maturace a „processing“, tedy posttranslační modifikace a transport z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu a na apikální membránu buněk, regulace pomocí chaperonů (toto je případ nejčastější mutace F508del)
3. třída – je narušena regulace iontového kanálu; asi 3% CF chromozomů; př. G551D

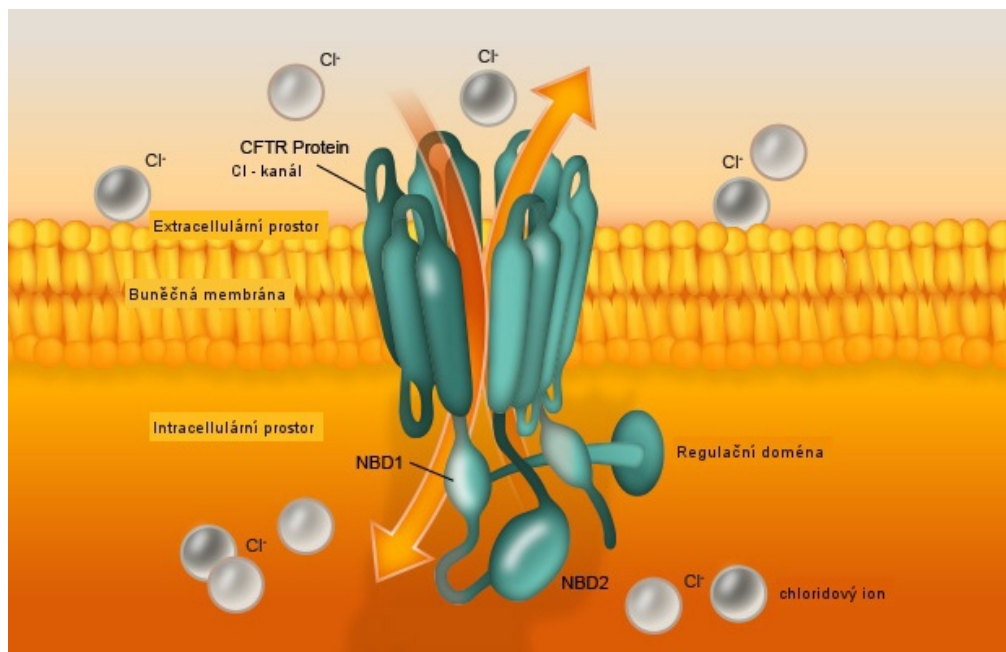
4. třída – alternativní konduktance a pozměněná selektivita, zasažena je oblast póru chloridového kanálu; př. R117H

5. třída – redukováná syntéza, ovlivněna stabilita mRNA

6. třída – zrychlená, vystupňovaná degradace (ovlivněna stabilita CFTR proteinu)

Obecně lze shrnout, že lidé s mutacemi tříd 1-3 mají závažný průběh onemocnění a jsou diagnostikováni časně, zatímco pro pacienty s mutacemi tříd 4-6 je charakteristický „mírnější“ průběh, a spíše atypické formy CF [1], často i diagnosa až v dospělém věku [7].

Protein CFTR se skládá z 5 domén – 2 transmembránové, 2 vázající nukleotidy a 1 regulační (obr. 1.2 [8]). Tento protein zastává hlavní funkci jako chloridový kanál řízený pomocí cAMP a je lokalizovaný na apikální membráně epitheliálních buněk (byl detekován i na apikální membráně řasinkových buněk vnitřní části epitelu [9]).



Obr. 1.2: Schéma proteinu CFTR. NBD 1,2 = nucleotide binding domain (nukleotidy vázající doména) [8]

Funkce chloridového kanálu není jedinou funkcí proteinu CFTR, předpokládá se i celá řada dalších, ať už přímých, nebo na bázi regulace dalších systémů, jak je uvedeno s následujícím seznamu.

Předpokládané funkce a děje na nichž se podílí CFTR [10]:

- transport Cl^- a HCO_3^+ iontů
- regulace ostatních iontových kanálů (zejména ENaC – epitheliální sodíkový kanál)
- intravesikulární acidifikace
- endocytická cirkulace
- regulace aquaporinu 3 (účastní se transportu vody přes membrány, umožňuje výstup reabsorbované vody)
- apoptosa epitheliálních buněk
- vazba a internalizace *Pseudomonas aeruginosa*
- komunikace na bázi gap junction
- vliv na viskozitu extracelulární kapaliny
- transport glutathionu
- zvýšená sulfatace a snížená sialylace hlenu
- vliv na aktivitu NF- κ B
- produkce chemokinů

Z uvedeného je patrné, že problematika cystické fibrosy není omezená pouze na samotnou funkci CFTR, ale důležitou roli hrají i další interakce a propojení CFTR v organismu (zejména v dýchacím ústrojí).

1.1.2 Příznaky a diagnosa onemocnění

Cystická fibrosa je vázaná zejména na dýchací a trávicí ústrojí, nicméně lze shrnout, že s výjimkou CNS postihuje určitou měrou i ostatní systémy. Většina nemocných vykazuje symptomy od časného dětského věku a kromě respiračních symptomů (sinopulmonálních) také známky pankreatické nedostatečnosti (typická CF). Menší část pacientů s CF pak trpí

mírnějšími formami postižení (bez pankreatické insuficience). První příznaky se často projeví již v prvních měsících či rocích života, v případě atypických forem CF bývá diagnosa někdy stanovena až v dospělosti [7].

1.1.2.1 Příznaky nemoci

V důsledku poruchy transportu iontů chloridovými kanály se u 85 % nemocných objevuje nedostatečná exokrinní činnost pankreatu. Dětsí pacienti proto neprospívají, nepřibývají na váze, ačkoli většinou hodně jedí. U 10–15 % novorozenců s CF dochází ke vzniku mekoniového ileu (jedná se o střevní neprůchodnost způsobenou obsahem střeva plodu). Postnatálně vzniklou komplikací je pak distální intestinální obstrukční syndrom (DIOS). Recidivující pankreatitida je častá hlavně u nemocných se zachovalou funkcí pankreatu.

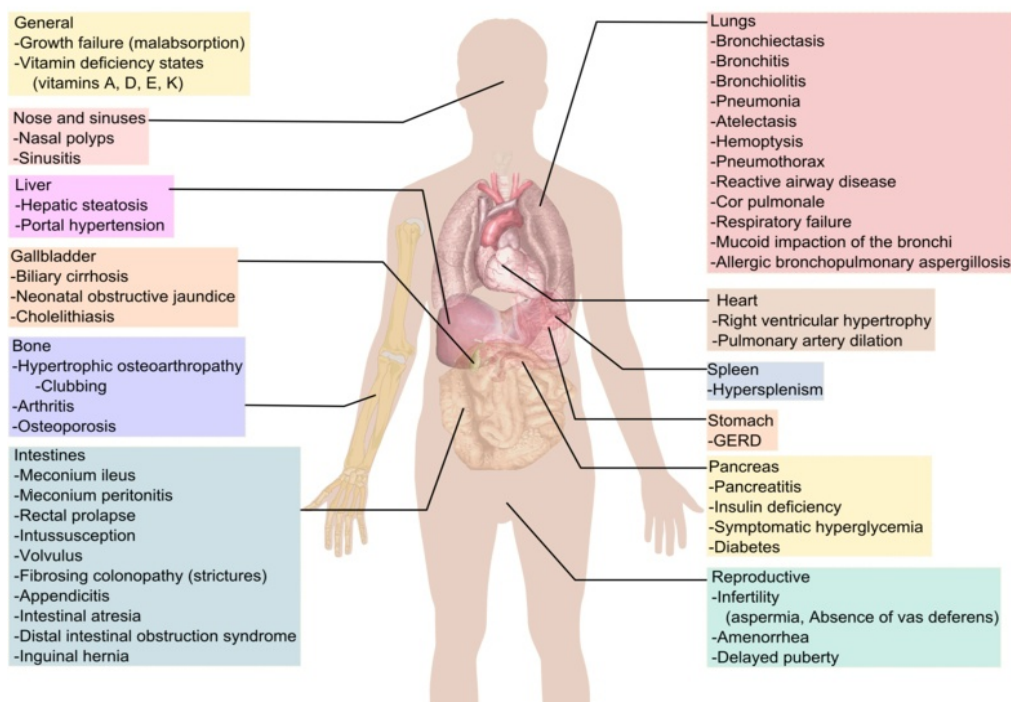
Narušení produkce potu je charakteristickou známkou CF. Pot nemocných CF je výrazně slanější než pot zdravých, obsahuje až pětkrát více solí – odtud někdy používané označení CF jako „nemoc slaných dětí“. Velké ztráty solí potem mohou vést až k těžkému rozvratu vnitřního prostředí, charakterizovaném nedostatkem iontů sodíku, chloridů a metabolickou alkalózou.

Mezi další komplikace řadíme i CF vázaný diabetes mellitus (z angl. „cystic fibrosis related diabetes“, CFRD). Svoji patogenezi se liší jak od diabetu mellitu 1. typu (na inzulinu závislý) tak od diabetu mellitu 2. typu (na inzulinu nezávislý). Podílí se na něm útlak Langerhansových ostrůvků fibrotickou tkání pankreatu a autoimunitní zánět. U řady nemocných se rozvíjí postižení jater (cystic fibrosis liver disease, CFLD). CFTR protein je exprimován mimo jiné i v buňkách epitelu žlučových cest. Poškozená sekreční funkce epitelu žlučových cest spolu se zvýšenou hustotou a sníženou alkalitou žluči vedou k obstrukci žlučových cest, duktulární proliferaci, zánětu a rozvoji fokální biliární cirhózy. Mezi další příznaky můžeme zařadit malabsorpci, sníženou funkci produkce pohlavních hormonů, nízkou fyzickou aktivitu. Komplikujícím faktorem je i kardiomyopatie, která může být i příčinou náhlého úmrtí. Proč k ní dochází, není zcela zřejmé. Zvažuje se i vztah k anémii a hypoproteinémií. Reprodukční trakt je u 98 % mužů s CF postižen kongenitální bilaterální absencí (agenezí) vas deferens - CBAVD (spermie se normálně tvoří, ale chybí schopnost ejakulace), což je příčinou obstruktivní azoospermie [11], [12].

Kompletní výčet zdravotních komplikací a systém na který jsou vázané je uveden v tabulce 1.1 a graficky nastíněn na obrázku 1.3 [13].

Tabulka 1.1: Manifestace cystické fibrosy.

Sino-pulmonální	Vedlejší nosní dutiny	Nosní polypy a pansinusitida
	Bronchy, bronchioly, plíce	Chronický produktivní kašel a plicní hyperinflace (chronická bronchitida či CHOPN-like)
		Suchý kašel a pískoty na hrudníku (astma-like)
		Bronchiektazie, hemoptýza, alergická bronchopulmonální aspergilóza
		Lobární, segmentární a subsegmentární atelektázy
		Chronická plicní konsolidace (pneumonické infiltráty)
		Sekundární spontánní či iatrogenní pneumotorax
		Plicní fibróza, plicní srdec, respirační selhávání
Gastroenterologické	Pankreas	Recidivující pankreatitida, pankreatická nedostatečnost a proteinová a energetická malnutrice (kachexie, edémy, hypovitaminózy)
	Hepar a kolon	Steatóza, biliární cirhóza
Urogenitální	muži	obstruktivní azoospermie
	ženy	Neprostupnost cervikálního hleny, inkontinence moči
Další	Paličkovité prsty, akutní ztráta solí, chronická metabolická alkalóza, osteoporóza, CF artropatie	



Obr. 1.3 Manifestace cystické fibrosy, multisystémové onemocnění. [13]

1.1.2.2 Diagnostika CF

Nejčastěji se CF diagnostikuje na základě klinických příznaků. Klinické podezření se potvrdí potním testem a následně molekulárněgenetickým vyšetřením DNA. V současné době už je CF součástí povinného novorozeneckého screeningu.

V prenatálním období je diagnosticky významný nález hyperechogenity dutiny břišní u plodu v 17.–20. týdnu těhotenství v důsledku obstrukce terminální části ilea abnormálně vazkým mekoniem u plodů s prenatální formou CF. Většinou se jedná o přechodný nález, protože zahuštěný obsah terminálního ilea se po 20.–21. týdnu rozpustí a jen v 10–15 % případů přetrvá do narození a projeví se mekoniovým ileem [1], [11].

V důsledku malabsorpce jsou časté i příznaky hypoproteinémie, hypoalbuminémie s edémy, anémie, popřípadě kožní projevy nedostatku stopových prvků a vitamínů. V imunologickém nálezu může být nápadné snížení nebo naopak zvýšení hladin imunoglobulinů (hlavně IgG) a pozitivita autoprotilátek, zvláště proti cytoplazmě neutrofilů.

- **Potní test** neboli vyšetření chloridů v potu je standardní metodou diagnostiky CF. Provádí se ambulantně a je zcela bezbolestný. Trvá okolo 45 minut. Výsledek je znám do 3 hodin. Ke stimulaci pocení se standardně používá pilokarpinová iontoforéza (metoda Gibson & Cooke, 1959 [14]). Normální koncentrace chloridů v potu se pohybuje mezi 10–30 mmol/l potu, u normálních dětí je koncentrace obvykle 10–20 mmol/l potu, s věkem hodnota mírně stoupá. U CF jsou hodnoty nad 60 mmol/l. Hraniční hodnoty, tj. mezi 30 a 60 mmol/l potu, diagnózu ani jednoznačně nepotvrdí ani nevyloučí. Často je hraniční koncentrace u atypických forem CF a u 4. – 6. třídy mutace CFTR [7]. V případě hraničních nebo vysokých hodnot diagnózu pak upřesní, resp. potvrdí molekulárněgenetické vyšetření [11], [12].
- **Molekulárněgenetickým vyšetřením DNA** získané z krve se hledají mutace v CFTR genu, které způsobují CF. V rizikových rodinách, kde se již narodilo dítě s CF, resp. rodiče jsou zjištěnými nosiči mutací CFTR genu, lze provést **prenatální molekulárněgenetickou diagnostiku**, a to již od 13. týdne těhotenství vyšetřením mikrovilárních buněk z biopsie choria nebo od 17. týdne z buněk plodové vody získaných amniocentézou. Prokáže-li se vývoj plodu s klasickou formou CF, je možné navrhnout zákonem povolené přerušení těhotenství do 24. týdne. V současné době lze rodičům, kteří mají 25% riziko, že se jim narodí dítě s CF, nabídnout umělé oplodnění, při kterém jsou k těhotenství vybrána pouze „zdravá“ embrya, tedy taková, která nemají dvě mutace genu pro CF (preimplantační genetická diagnostika) [11], [15]. Další možností je v případě sporného nálezu potního testu a molekulárněgenetického vyšetření průkaz **abnormálního transepiteliálního rozdílu potenciálů na nosní, případně rektální sliznici**.

- **Novorozenecký screening** cystické fibrózy se provádí vyšetřením kapky krve odebrané z patičky novorozence, ze které se testují i další vrozená onemocnění. Od roku 2009 je novorozenecký screening CF zařazen do inovovaného celoplošného screeningu vybraných vrozených onemocnění. Ze suché kapky krve, získané z patičky novorozence, se na filtračním papírku vyšetřuje imunoreaktivní trypsin (IRT), což je produkt buněk acinů pankreatu, jehož zvýšená hladina je způsobena jeho únikem do cirkulace v pankreatu. Je poměrně senzitivní, ale relativně málo specifický. Zjištěnou zvýšenou koncentraci IRT tedy následuje molekulárněgenetická analýza nejčastějších mutací CFTR genu. Pokud jsou nalezeny 2 mutace (na obou chromozomech), je diagnóza jistá a následuje zahájení léčby. Pokud je nalezena pouze 1 mutace, je dítě voláno k potnímu testu. Je-li potní test negativní, dítě je s největší pravděpodobností zdravým nosičem mutace. Je-li test pozitivní, je velká pravděpodobnost, že se o cystickou fibrózu jedná, a následuje pátrání po druhé, vzácnější mutaci; současně však, aby nedošlo k časové prodlevě, je nutné zahájit komplexní vyšetření dítěte a preventivní péči hlavně o dobrou průchodnost a čistotu dýchacích cest k zabránění rozvoje komplikací [16], [17].

1.1.3 Terapie

V současné době jsou dostupné způsoby terapie pouze řešením komplikací vyplývajících z podstaty onemocnění. Základem současné terapie je péče o dobrou průchodnost dýchacích cest inhalacemi a následnou fyzioterapií a dále péče o dobrý stav výživy, tj. vysokokalorická strava a užívání trávicích enzymů. Uplatňuje se i potlačení infekce a zánětu agresivní protizánětlivou antibiotickou léčbou [11]. Pro pacienty s terminálním stadiem plicního poškození je jedinou nadějí na prodloužení života transplantace plic. Novinkou a velkým příslibem jsou nově vyvinuté korektory CFTR firmou Vertex Pharmaceuticals, které představují kauzální léčbu pacientů s CF.

- **Inhalační terapii** provádějí pacienti třikrát denně formou speciálního inhalačního dýchání, které je naučí fyzioterapeut. Inhalují se léky ředící hustý hlen. Roztok amiloridu ve fyziologickém roztoku působí jako blokátor reabsorpce sodíku, upravuje tak porušenou funkci chloridového kanálu; nemá žádné vedlejší účinky a je velmi dobře tolerován. Hypertonický 3–7% roztok NaCl poměrně vydatně ředí sputum, zvažují se i jeho baktericidní účinky, problémem však je dráždivost u řady pacientů a možnost vyvolání bronchospazmu. Dále je v případě hnisavého sputa využívána rekombinantní lidská DNAasa – dornasa alfa, která v purulentním hlenu štěpí DNA uvolněnou z rozpadlých polymorfonukleárů a tím snižuje viskozitu sputa.
- Nemocní CF s pankreatickou insuficiencí musí užívat před každým jídlem **substituci pankreatických enzymů** ve formě acidorezistentních minimikropelet v želatinových kapslích. Dbáno je také na správné složení stravy, zastoupeny musí být všechny živiny, v přiměřeném množství i vláknina. Vyžadována je suplementace vitaminů rozpustných v tucích a NaCl. Vhodné je i podávání probiotik, zvláště při léčbě antibiotiky.
- **Terapie respiračních infekcí (antibiotická léčba)** - Při každé akutní exacerbaci respirační infekce jsou obvykle využívána širokospektrá antibiotika, zejména ta s protistafylokokovým účinkem (amoxicilin s klavulanátem, kotrimoxazol, cefalosporiny I. a II. generace, doxycyklin), dále colistin a aztreonam. Při záchytu *Pseudomonas aeruginosa* (PA) je cílena antibiotická terapie (tobramycin) proti tomuto patogenu, a to i v případě, že nejsou přítomny klinické příznaky exacerbace respirační infekce. Poměrně časté jsou mimo jiné i infekce mykotické - *Candida spp.* a *Aspergillus fumigatus*. Tehdy, zvláště při masivním nálezu těchto patogenů ve sputu, je nutná léčba antimykotiky. Antibiotickou léčbu je možno doplnit o léčbu protizánětlivou [18]. Prokázán byl pozitivní vliv ne-antibakteriálních účinků makrolidů, zvláště azitromycinu, který nejen zlepšuje

reologické vlastnosti sputa, ale působí i proti zánětlivým cytokinům IL-1 a IL-8. Kortikoidy se podávají jen krátkodobě při těžkých exacerbacích nebo v případě alergické bronchopulmonální aspergilózy [19].

- **Kauzální léčba – potenciátory a korektory CFTR.** Tyto látky již neřeší pouze symptomy, ale příčinu onemocnění. Jedná se o látky vyvinuté americkou firmou Vertex Pharmaceuticals ve spolupráci s Cystic Fibrosis Foundation [20]. První látkou je ivacaftor (VX-770, komerční název Kalydeco) který slouží jako tzv. potenciátor CFTR - obnovuje správnou funkci poškozeného CFTR, který je však na apikální membráně buněk přítomen. Ivacaftor je cílen primárně na mutaci G551D (tedy 3. třída mutací CFTR). Tento lék je již registrován FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (Evropská léková agentura). Další látkou je pak lumacaftor (VX-809), který slouží jako tzv. korektor CFTR, který zajišťuje transport proteinu na buněčnou membránu a tvorbu chloridového kanálu – cílí tedy na 2. třídu mutací CFTR kam patří i nejčastější mutace F508del [21]. Tato látka je ve 3. fázi klinického testování [22].
- **Transplantace plic** je jedinou léčebnou možností pro pacienty v konečném stadiu progradujícího plicního onemocnění. Problémem je zde nedostatek dárcovských orgánů, časté komplikace po transplantaci (odmítnutí allograftu) a mimo jiné kolonizace *Burkholderia cepacia* komplexem (zejména *B. cenocepacia*), které představující značné riziko infekčních komplikací po transplantaci [11], [23].
- **Imunizace.** Dosavadní terapie infekcí *Pseudomonas aeruginosa* stojí zejména na antibioticích. Tato terapie je ovšem komplikována vznikem rezistencí a řadou nežádoucích účinků na lidský organismus vlivem vysokých dávek antibiotik. Mezi nové možnosti terapie tak určitě patří i využití imunizace.
Formou aktivní imunizace je vakcinace pacientů specifickými vakcínami. Studována je multivalentní vakcína, cílená na řadu bakteriálních antigenů, která je připravena kombinací 3-4 oslabených mukosních kmenů PA, které se liší sérotypy bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). U této vakcíny byla prokázána odezva

protektivní imunity proti infekci PA [24]. Mezi nevýhody aktivní imunizace patří skutečnost, že daná skupina pacientů musí být proti danému antigenu imunizována v dostatečném předstihu a imunitní odpověď organismu musí mít dostatečnou intenzitu. V případě CF pacientů je třeba zvážit vhodnost aktivní imunizace vzhledem ke skutečnosti, že imunitní systém je narušen, často je přítomna zánětlivá reakce a po kolonizaci dýchacích cest PA už protilátková odpověď organismu není obvykle účinná.

Naopak pasivní imunizace nevyžaduje časový předstih a je zde menší riziko nežádoucích odpovědí organismu. Pasivní imunizace navíc může být prováděna opakovaně po delší dobu i jako prevence. Jako jedna z možností pasivní imunizace se jeví slepičí protilátky proti určitým antigenům bakterií ohrožujících pacienty s CF. Slepičí protilátky jsou dobře dostupné a pro lidský organismus nejsou škodlivé (mimo jiné neaktivují komplement) a jsou do jisté míry příbuzné s lidskými IgG (viz. kap. 1.3.2).

1.2 Respirační systém

V případě cystické fibrózy jsou život ohrožující komplikace vázány hlavně na respirační ústrojí. Vlivem změn v respiračním traktu dochází ke kolonizaci řadou mikroorganismů. Některé patogeny jsou typické pro CF (*Pseudomonas aeruginosa* - PA, *Burkholderia cepacia* komplex -Bcc) a významně se podílejí na rozvoji chronické infekce, což je jedna z hlavních příčin postupného poškození plicních funkcí. U zdravých jedinců bez dalších zdravotních komplikací (imunodeficiency, oslabení organismu např. po transplantaci) jsou tyto patogenní mikroorganismy obrannými mechanismy na bázi vrozené imunity eradikovány a nedochází ke kolonizaci a rozvoji chronické infekce.

1.2.1 Plicní systém pacientů s CF

Dýchací systém zprostředkovává nepřímý kontakt vnitřního prostředí organismu s atmosférickým vzduchem. Sestává se z dýchacích cest, plic, plicní cirkulace, aparátu zajišťující ventilaci a z řídicího centra nervového systému včetně systému specifických receptorů. Dýchací ústrojí člověka zajišťuje rovnováhu i při expozici zevním vlivům, včetně inhalace různých částic, mikroorganismů.

V respiračním systému můžeme rozlišit tzv. „respirační zónu“, která zahrnuje bronchioly, alveolární kanálky a váčky. Zde nejsou přítomny cíle, pohárkové buňky ani submukosní žlázy, obranu tedy zajišťují zejména alveolární makrofágy a defensiny. Zde je také produkován hlen. Naopak trachea, bronchy a terminální bronchioly představují tzv. „přívodní zónu“ (conductive zone), kde jsou ciliární buňky i submukosní žlázy.

Tubuloalveolární anatomická struktura dýchacího ústrojí umožňuje dokonalou disperzi inhalovaných antigenů a zachycení celé řady částic již v dýchacích cestách. Malé částice v průměru 5-10 μm jsou odstraňovány mukociliárním transportem po zachycení ve vrstvě hlenu, který pokrývá dýchací cesty. Pohyb řasinek epitelu směrem orálním umožňuje posun hlenu s částicemi až do laryngu, kde jsou spolknuty nebo vykašlány. Částice pod 2 μm jsou z velké míry fagocytovány až alveolárními makrofágy v plicních sklípcích [25].

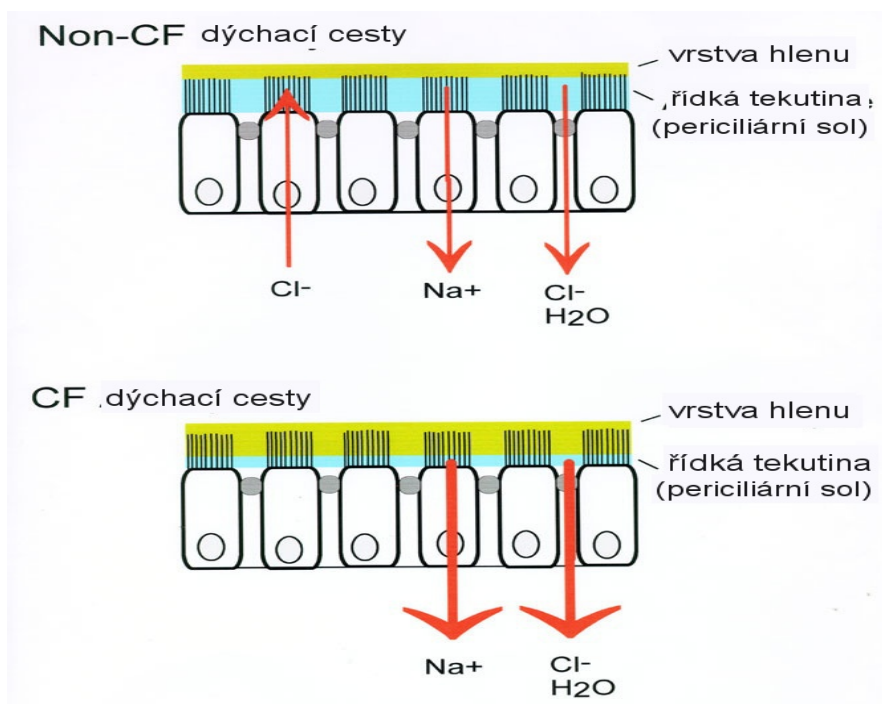
Na správném fungování respiračního systému se podílí i imunitní systém plic, který je důležitý pro zachování homeostázy a jehož funkce je narušena u chronických zánětlivých stavů včetně cystické fibrózy.

V současné době je podrobněji studována funkce **epiteliálních buněk**, které nezajišťují pouze mechanickou bariéru, ale mají velmi vysoký metabolický obrát s bohatou produkcí chemokinů, prozánětlivých cytokinů jako jsou $\text{TNF-}\alpha$ IL-1 β , dále IL-6 [26]. Stoupá i produkce oxidu dusnatého a leukotrienů [27]. Epiteliální buňky jsou také schopny řídit kontraktilitu fibroblastů [28].

Pneumocyty II. typu jsou významným zdrojem plicního surfaktantu, což je směs fosfolipidů a proteinů pokrývající stěnu plicních sklípků. U CF jsou popsány změny ve složení těchto fosfolipidů [29]. Důležitou součástí surfaktantu jsou i proteiny. V současné době jsou známy 4 hlavní proteiny surfaktantu, označované jako SP (z ang. „surfactant protein“) - A, B, C, D. A a D jsou rozpustné, zatímco B a C jsou membránové. Tyto proteiny patří mezi kolektiny (lektiny mající „collagen-like region“ a „lectin-region“),

kteře selektivně rozeznávají oligomannosidy a účastní se především opsonizace a fagocytózy (jsou součástí lektinové cesty aktivace komplemetu) [30]. SP-A a D jsou syntetizovány pneumocyty II. typu. Oba tyto proteiny regulují funkci řady imunitních buněk, je popsán i jejich vliv na aktivaci alveolárních makrofágů. Zánětlivá odpověď v CF plicích se podílí na narušení syntézy, sekrece a případné cirkulaci pulmonárního surfaktantu [29].

Postižením respiračního traktu trpí všichni nemocní s CF. Základní příčinou je snížení sekrece chloridových iontů serózními buňkami respiračních žlázek [1], [12]. Současně s tím dochází ke zvýšené resorpci sodíkových iontů z oblasti řídké tekutiny (periciliárního solu) na povrch epitelálních respiračních buněk, ve které se pohybují respirační cilie. Tato tekutina je u pacientů s CF zahuštěna a redukována, což vede k omezení ciliárního pohybu. Dochází i ke změně složení vazké gelové hlenové vrstvy nad ní, do které jsou zachycovány škodliviny. Všechny tyto změny se pak uplatňují v poruše mukociliární clearance, která vede k zadržování hlenu v dolních dýchacích cestách (schematicky zobrazeno na obr. 1.4, dle [31]).



Obr. 1.4 Schématické znázornění změn v respiračním systému CF pacientů, porucha mukociliární clearance.[31]

V tomto prostředí je také nižší hladina kyslíku a s tím souvisí přechod bakterií na anaerobní respiraci, což má za následek přechod v mukoidní formu tvořící alginát a následně biofilm. Tato bakteriální kolonizace pak přerůstá v onemocnění, které vede k chronickému zánětu respirační sliznice. Výsledkem chronického zánětu je tvorba četných bronchiektazií, s následnou fibrotizací parenchymu a emfyzému. Dochází až k destrukci sliznice a plicé současně s prohlubujícím se zhoršením mukociliární clearance. Vlivem hustoty hlenu a tvorby biofilmu je problém pro neutrofily dostat se přímo k mikroorganismu. Neutrofily uvolňují sice antimikrobiální látky, ale ty přes biofilm pronikají jen obtížně a účastní se naopak postupného poškození plic [32].

1.2.2 Buňky plicního systému

V současné době jsou pro studium celé řady patogenezí využívány *in vitro* modely – zejména tkáňové a buněčné kultury. Pro studium cystické fibrosy existuje několik možných modelů, v této práci jsou použity tři typy buněk plicní tkáně – A549, NuLi-1 a CuFi-1. Všechny uvedené linie jsou adherentní.

- **A549** – jedná se o linii odvozenou roku 1972 (D. J. Giard et. al.) z rakovinné plicní tkáně 58-letého muže. Jde o lidské alveolární buňky bazálního epitelu. Jejich normální fyziologickou funkcí je difuze vody a elektrolytů v plicních sklípčích a plicní tkáni. Tyto buňky jsou dobře charakterizovány a standardizovány pro využití v molekulární biologii a jsou využívány jako model pro studium nejen rakoviny plic [33], [34].. Doba zdvojení (PD = population doubling) je v případě této linie uváděna 22 hodin.
- **NuLi-1 (ATCC® CRL-4011), CuFi-1 (ATCC® CRL-4013)** – jedná se o buňky odvozené z lidské plicní a bronchiální tkáně (hAE = human airway epithelial cells), které byly po izolaci immortalizovány tak, aby získaly vlastnosti permanentní buněčné linie. Immortalizace byla provedena transformací buněk pomocí retrovirálních vektorů s hTERT (katalytická složka telomerasy) a HPV-16 E6/E7 geny (human papilloma virus 16). V důsledku exogenní exprese telomerasy tak

nedochází k zastavení růstu buněk v kultuře. Imortalizace a charakterizace linií byla provedena Zabnerem et. al. [35]. V případě kultivace za určitých podmínek - ALI (air-liquid interface), jsou buňky schopné tvořit polarizovaný diferencovaný epitel, který vykazuje transepitheliální odpor a fyziologii iontového kanálu [35]. NuLi-1 (ATCC® CRL-4011) jsou buňky zdravého člověka, i po imortalizaci si udržely schopnost tvořit epitel, který si zachoval aktivní transport Na^+ a Cl^- iontů. Doba zdvojení je udávána u této linie okolo 43 hodin [36]. CuFi-1 (ATCC® CRL-4013) jsou buňky pacienta s cystickou fibrosou homozygotního s mutací F508del/F508del. V případě této linie je zachován pouze aktivní transport Na^+ iontů, transport Cl^- je nedostatečný, jak odpovídá patologii CF. Doba zdvojení je udávána okolo 26 hodin. Výhodou těchto linií v experimentální činnosti je mimo jiné i reprodukovatelnost – odpadají rozdíly mezi jednotlivými dárci jako je tomu v případě primárních linií izolovaných z jednotlivých dárců [37].

Existují i další modelové linie pro studium cystické fibrosy ať už stejným způsobem imortalizované linie s jinou mutací (ATCC, CuFi-4,5,6) nebo linie serózních buněk tracheálních žláz - HTGS cells (human tracheal gland serous cells) označované jako CF-KM4 [38].

Primární buňky izolované přímo od CF a non-CF pacientů pomocí metody „brushing“ byly v souvislosti s touto prací také kultivovány, pro experimentální činnost však nebyly využity vzhledem k malému výtežku, omezené dostupnosti vzorků a omezením primárních linií – omezený počet dělení [39].

1.3 Imunitní systém

Imunitní systém zastává klíčovou úlohu v obraně organismu proti mikroorganismům a dalším patogenům. Sám o sobě u CF pacientů imunitní systém poškozen není, k rozvoji sekundárních poškození dochází až následně vlivem probíhajícího onemocnění.

V imunitním systému rozlišujeme vrozenou a adaptivní (specifickou) imunitu. V případě CF se větší měrou podílí imunita vrozená, ale i procesy adaptivní imunity jejíž podstatou je tvorba specifických protilátek proti určitému antigenu mají nezastupitelnou roli. Rozlišujeme také složku buněčnou a humorální.

1.3.1 Imunitní systém u CF pacientů

Vrozená imunita, sloužící jako „bariéra“ proti kolonizaci a infekci se na obraně proti patogenu podílí jako první. Teprve poté dochází k zapojení druhotné, specifické imunitní odpovědi aktivované určitým antigenem a vázané na odpověď T a B lymfocytů.

V dýchacích cestách jsou odpovědi vrozené imunity doplněny dalšími klíčovými obrannými mechanismy jako je produkce hlenu a jeho vykašlávání a především mukociliární clearance.

Do buněčné složky nespecifické imunity zde řadíme neutrofile, alveolární makrofágy i samotné epitelální buňky. Buněčná složka se uplatňuje zejména jako efektor v eradikaci mikroorganismů. U CF pacientů jsou však poškozeny i další pomocné obranné mechanismy jako jsou vlastnosti hlenu a porušení mukociliární clearance). Vlivem těchto změn je znemožněno neutrofilům a makrofágům plnit jejich funkci a dochází tak k jejich hromadění v místě zánětu [40].

Imunitní systém produkuje řadu antimikrobiálních látek, především na bázi peptidů. Tyto látky jsou produkovány jednak neutrofile (α -defensiny) a také epitelálními buňkami a submukosními žlázami (β -defensiny, katelicidiny). V případě pacientů s CF je účinnost těchto látek snížena a je to vysvětlováno jednak vysokou koncentrací solí ve viskózním hlenu a také postupným poškozením buněk, které je sekretují [1].

Důležitou součástí vrozené imunity, která se účastní obrany proti mikroorganismům je komplement. Mezi jeho hlavní funkce řadíme opsonizaci, chemotaxi a osmolýzu mikroorganismů. K aktivaci komplementu může dojít třemi cestami a sice klasickou, alternativní a lektinovou [41]. V souvislosti s CF je studována zejména lektinová cesta a především její klíčová molekula MBL („mannose-binding lectin“), který specificky rozpoznává sacharidové struktury mikroorganismů a podílí se na jejich opsonizaci ať už přímo, nebo právě aktivací imunitní odpovědi komplementu. Byla nalezena celá řada

polymorfismů v genu kódujícím tento lektin, z nichž některé vedou k deficitu tohoto lektinu. V případě CF pacientů je produkce MBL nižší, ale nebyl prokázán přímý vliv této skutečnosti na funkci plic ani vznik chronické infekce PA [42].

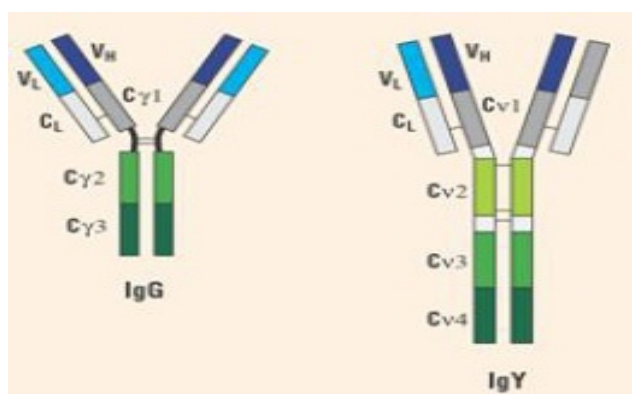
Z mechanismů adaptivní (specifické) imunity se zde uplatňují především obranné mechanismy založené na protilátkách. Protilátky specificky rozpoznávají určitý antigen za vzniku komplexu antigen-protilátka, čímž je antigen buď „neutralizován“ nebo opsonizován, případně je zprostředkována imunitní odpověď vedoucí k aktivaci komplementu [41]. V případě CF pacientů je však účinek protilátek silně zeslaben (bakterie nejsou opsonizovány ani eradikovány z organismu).

Defekt v CFTR je jedna z možných příčin dysregulace cytokinové sítě. Snížené množství (nebo nepřítomnost) funkčního CFTR proteinu na buněčné membráně vede ke zvýšené aktivaci NF- κ B. K této aktivaci dochází prostřednictvím inhibičního účinku signálních komplexů na membránový receptor. To v konečném důsledku vede k aktivaci pro-zánětlivé kaskády se zvýšenou produkcí pro-zánětlivých cytokinů zejména IL-8. IL-8 mimo jiné zprostředkovává chemotaxi neutrofilů. Mikrobiální infekce přispívá k aktivaci NF- κ B, čímž se dále prohlubuje plicní poškození, kterého se účastní IL-8 indukované neutrofily, které v místě zánětu nemohou plnohodnotně plnit svoji fyziologickou funkci. Aktivované neutrofily vyvolávají další pro-zánětlivou odpověď (TLR, IL-1, TNF- α) a nedostatečná regulace vlivem nefunkčního nebo chybějícího CFTR tak tvoří bludný kruh zánětlivých reakcí, které se významně podílejí na patogenezi chronického plicního onemocnění. Snížená exprese CFTR byla nalezena i u některých jiných chronických plicních onemocněních jako je CHOPN (chronická obstrukční plicní nemoc) [43]. Na tvorbě inhibitoru NF- κ B se významně podílí proti-zánětlivý IL-10.

1.3.2 Slepíčí protilátky jako možnost terapie

Protilátkami je obecně označována skupina imunoglobulinů, což jsou glykoproteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 150 - 900 kDa. Jsou jednou ze základních složek specifické imunity. Rozlišujeme pět tříd imunoglobulinů (IgA, IgE, IgG, IgM a IgD)[41]. U plazů a ptáků nacházíme ve vaječném žloutku protilátky typu IgY (analogické s lidskými IgG), zatímco ve vaječném bílku jsou zastoupeny protilátky tříd IgM a IgA. V této práci se dále zabýváme pouze problematikou slepičích protilátek typu IgY.

Slepičí protilátky typu IgY se vyznačují molekulovou hmotností asi 170 000Da, funkčně jsou příbuzné s lidskými IgG (u ptáků plní stejnou funkci jako IgG u savců) a IgE. Obsahují jednak dva těžké (H) řetězce spojené v pantové oblasti disulfidickými můstky a 2 lehké (L) řetězce [44]. N-koncový úsek řetězců je označován jako variabilní a je zodpovědný za vazbu na antigen. Zbývající část molekuly je označována jako konstatní část a v případě IgY je silně glykosylována [45]. Strukturu IgY a IgG zobrazuje obr. 1.5 [46]. IgY obsahuje oproti IgG další doménu v konstantní části a flexibilita IgY je nižší.



Obr. 1.5 Srovnání struktury lidských IgG a slepičích IgY protilátek. [46]

V – variabilní část protilátky, vazba na antigen, C – konstatní část protilátky, L – lehký řetězec, H – těžký řetězec

Využití slepičích protilátek proti *P. aeruginosa* jako prostředku bránícího interakci bakterie s hostitelskými buňkami je jednou ze studovaných možností terapie. Studuje se uplatnění IgY jakožto agens pasivní imunizace. Otázkou je, zda cílit protilátky pouze na vybrané virulenční faktory PA jako jsou např. lektiny, proteiny bičíku, LPS nebo na bakteriální buňku jako celek. Studovány jsou oba přístupy. Výhodou slepičích protilátek je zejména jejich ekonomická a technologická dostupnost, jejich získání navíc není spojeno s usmrcením imunizovaného zvířete – IgY jsou sekretovány do vaječného žloutku (fyziologicky slouží k ochraně plodu) [47] a odběr vajec tedy nijak neomezuje imunizované zvíře.

V rámci využití slepičích protilátek u CF pacientů byl studován jejich vliv při orálním podání. U jedinců kteří takto užívali IgY proti *P. aeruginosa* bylo zaznamenáno méně pozitivních kultivačních nálezů a také prodloužení intervalu mezi první a následně zaznamenanou kolonizací, pozorován byl i delší čas zachování plicní funkce [48].

1.4 Mikroorganismy vázané na CF

Pacienty s CF ohrožují především mikrobiální infekce respiračního systému, se kterými se imunitní systém pacientů nedokáže správně vyrovnat. Často dochází k rozvoji chronické infekce, která je již těžko potlačitelná i antibiotickou léčbou. Chronická infekce se významně podílí na zhoršení plicní funkce a je jednou z příčin vyšší morbidity a mortality CF pacientů [1]. Mikroorganismy zachycené u CF pacientů jsou z větší části pouze oportunní lidské patogeny a jejich patogeneze je vázána hlavně na CF. Typickými zástupci jsou *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* komplex.

1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gram-negativní aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru (obr. 1.6 [49]) Běžně se vyskytuje v půdě, ve vodě (vodovodní potrubí, kohoutky), nalézt ji můžeme i v nemocničním prostředí, kde hrozí kontaminace nebulizátorů, katetrů, atd. Bakterie vykazují mobilitu, pohyb je zajišťován polárními bičíky. Řazena je mezi nefermentující bakterie, sacharidy disimuluje přes Entner-Doudoroff cestu. V případě nedostupnosti kyslíku je schopna jako elektronový akceptor využít NO_3^- . Optimální teplotní rozmezí pro růst je v tomto případě 30-37°C. Jedná se o mikroorganismus odolný vůči poměrně vysokým koncentracím solí a je také přirozeně rezistentní na řadu antibiotik.

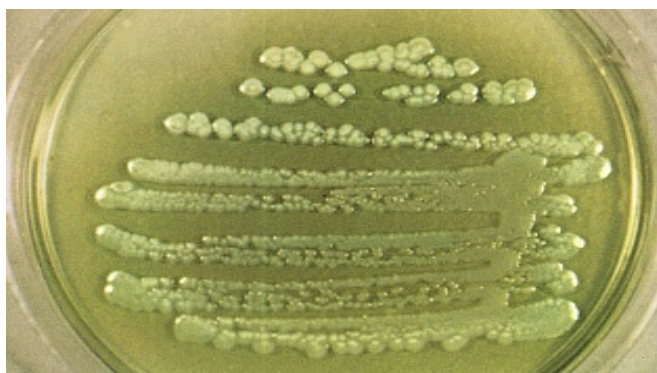
Je schopna tvořit rozpustné pigmenty – modro-zelený pyocyanin a fluoreskující žluto-zelený pyoverdin. Kromě pigmentů produkuje i extracelulární proteasy – elastasu a alkalickou proteasu, které usnadňují vazbu bakterie na buňky, zasahují do ciliární funkce a narušují epitel.



Obr. 1.6: Struktura *Pseudomonas aeruginosa*, snímek z elektronového mikroskopu. [49]

Jsou popsány 3 typy kolonií *Pseudomonas aeruginosa* (PA):

- malé, hrubé a nepravidelné kolonie – izolované s přírodních zdrojů (např. voda)
- velké, hladké, s plochými okraji – z klinických vzorků (Obr. 1.7)
- mukoidní, tvorba alginátu - z klinických vzorků pacientů s CF (případně jiných pacientů s chronickou kolonizací touto bakterií)



Obr. 1.7: Příklad kolonií PA z klin. vzorků na agaru. [49]

Pro pacienty s CF je typická především mukoidní forma PA, která se vyznačuje tvorbou alginátu. Jde o exopolysacharid tvořící matrix biofilmu, který představuje bariéru vůči hostitelově obraně. Chemicky se jedná o lineární kopolymer sestávající ze zbytků β -D-mannuronové a α -L-guluronové kyseliny. Mukoidní fenotyp *P. aeruginosa* vykazuje zvýšenou rezistenci (toleranci) na antibiotika především díky biofilmu a ne v důsledku mechanismů obvyklých u jiných typů mikroorganismů. Bakterie rostoucí v biofilmu vykazují prodloužení doby zdvojení (pomalý růst) a nízkou metabolickou aktivitu [50]. Některé studie naznačují, že bakterie rostou v biofilmu zejména v „přívodní zóně“ (conductive zone) v asociaci s hlenem a mohou sloužit jako rezervoár, který je chráněn vůči antibiotikům i buňkám imunitního systému [51]. Mukoidní forma PA také vyvolává zřetelnou odpověď protilátek [52].

Pseudomonas aeruginosa je oportunní lidský patogen. Ohrožující je právě pro pacienty trpící cystickou fibrózou, ale způsobuje zdravotní komplikace i u pacientů s oslabenou imunitou. Mezi nejčastější zdravotní komplikace jejichž původcem může být právě PA patří [49]:

- endokarditida – vlivem rozšíření bakterie krevním řečištěm, nejčastěji při použití protetických pomůcek (vnitřní výztuže)
- respirační infekce – vyskytují se hlavně u jedinců s oslabenými systémovými obrannými mechanismy, v případě pneumonie jsou rizikovou skupinou například pacienti po chemoterapii. Primární pneumonie postihuje pacienty s chronickým plicním onemocněním a s městnavým srdečním selháním.
- bakteremie a septikemie – k rozvoji dochází u pacientů s oslabenou imunitou – hematologické malignity, neutropenie, diabetes mellitus
- infekce CNS – bakterie se do CNS může dostat díky infekci ucha, případně po úrazu hlavy a invazivních operacích; způsobuje meningitidu, případně mozkový absces
- infekce ucha – obvykle vznik zánětu, především z vody (u plavců), popřípadě jako důsledek zranění
- oční infekce – kolonizace očního epitelu a poškození zraku vlivem bakterií produkovaných proteas

- kosti – vlivem rozšíření z jiného, primárního místa infekce, může způsobit chronickou osteomyelitidu
- infekce močových cest – zdrojem nákazy je obvykle nemocniční prostředí – katetrizace, operace; až 12% takto vyvolaných infekcí močových cest je způsobeno PA
- infekce gastrointestinálního traktu – primárně u oslabených jedinců, možný rozvoj gastroenteritidy a nekrotizující enterokolitidy
- ostatní – především dermatitidy a kožní infekce související s poraněním, ve velké míře se vyskytují u popálenin

1.4.2 Lektiny *Pseudomonas aeruginosa*

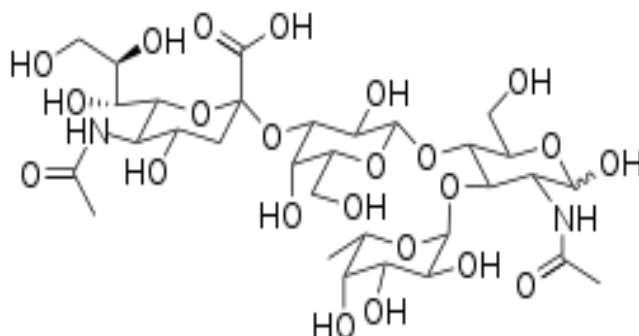
Celá řada mikroorganismů je vybavena lektiny, které zprostředkovávají vysoce selektivní adhezi na buňku specifickým rozpoznáváním sacharidových struktur. Mezi takto vybavené patogeny patří například *E. coli*, *Helicobacter*, *Kluyveromyces*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*, i *B. cepacia*.

Pseudomonas aeruginosa má 2 lektiny označované jako PA-IL (specifita vůči D-galaktose) a PA-IIIL (specifita vůči L-fukose).

PA-IL (označovaný také LecA) preferenčně váže terminální α -Gal epitopy, které jsou zastoupeny i v lidském organismu. Vazbu tohoto lektinu na buněčné receptory je možné inhibovat D-galaktosou a L-arabinosou, ale oligomerní sacharidové komplexy jsou obvykle efektivnější. Schopnost blokovat tento lektin mají i běžně užívaná potravní aditiva E410 (karubin) a E412 (guar guma), což jsou galaktomannany ze semen *Ceratonia siliqua* (karob) a *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) [53].

PA-IIIL (označovaný také LecB) tvoří tetramer, v jeho struktuře jsou koordinovány Ca^{2+} ionty, které také participují na interakci se sacharidem. Bylo také prokázáno, že tento lektin hraje roli v tvorbě bakteriálního biofilmu (LecB deficientní PA má narušenou tvorbu biofilmu) [54].

PA-III. vykazuje vysokou specifitu vůči oligosacharidům Lewis typu, které obsahují i fukosové zbytky. Vzhledem ke změnám glykosylace struktur na povrchu epitelů a plicních mucinů u pacientů s CF, které vedou k vyšší četnosti fukosylovaných oligosacharidů Lewis typu (např. sialyl Le^x, obr. 1.8 [55]), dochází ke specifické adhezi PA na epitel [56].



Obr. 1.8 Struktura determinantu sialyl-Lewis typu (Neu5Ac α 2-3 Gal β 1-4 [Fuc α 1-3] GlcNAc...). [55]

Fakt, že PA obvykle nenapadá zdravé jedince, ale kolonizuje 80% pacientů s CF je spojován právě se změnou glykosylace (sialylace) glykokonjugátů na povrchu epiteliálních buněk, které jsou rozpoznávány lektiny bakterie PA.

1.4.3 *Burkholderia cepacia* komplex

Jedná se o gram-negativní aerobní bakterii tyčinkovitého tvaru (obr. 1.9 [57], [58]). Běžně se vyskytuje v přírodě – stojaté vody, jezera a především v půdě, kde se často nachází v symbióze s kořeny rostlin. Vyznačuje se mimo jiné i produkcí rostlinných hormonů, řady antibiotik a látek s antifungálním účinkem (cepacin, chinolon pseudan). Některé kmeny jsou schopné jako zdroj uhlíku využít kromě celé řady látek dokonce i penicilin G [59].



Obr. 1.9: *Burkholderia cepacia* – zobrazení struktury (snímek z el. mikroskopu [58]) a kolonií na agaru [57].

B. cepacia je lidským oportunním patogenem, riziko představuje především pro pacienty s CF a dále pro pacienty s primárním či sekundárním poškozením imunity.

Poprvé byla posána kolem roku 1950 botanikem Walterem Burkholderem a nejprve byla chybně zařazena do rodu *Pseudomonas*. Až později byla upřesněna její taxonomie až do dnešního stavu, kdy je určována především pomocí molekulárně-genetických metod [58]. Na základě uvedených metod byly rozlišeny jednotlivé kmeny a vytvořena taxonomická jednotka genomovar. Genomovar je možno označit jako druh, který je definován pomocí molekulárně genetických metod, neboť jednotlivé genomovary nelze spolehlivě rozlišit běžnými mikrobiologickými metodami (kultivace, biochemické testy). Přehled jednotlivých označení a příslušného zařazení do genomovaru je uveden v Tab. 1.2 [1].

Tabulka 1.2: Taxonomie *Burkholderia cepacia* komplexu

Taxonomie <i>Burkholderia cepacia</i> komplexu		
genomovar I	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
genomovar II	<i>Burkholderia multivorans</i>	
genomovar III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
genomovar IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	
genomovar V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	
genomovar VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	
genomovar VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	
genomovar VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	
genomovar IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	
genomovar X	<i>Burkholderia ubonensis</i>	

Rod *Burkholderia* má i další zástupce, kteří ale už nejsou řazeni do *B. cepacia* komplexu. Jsou to například *B. gladioli*, *B. pseudomallei* a *B. mallei*.

Z hlediska zdravotních komplikací jsou pro CF pacienty nejrizikovější genomovary II, III a VI [32]. Byly popsány i případy nákazy více genomovary současně. Problémem je přenos mezi pacienty, proto byla mezinárodní organizací Cystic Fibrosis Foundation doporučena separace pacientů s Bcc (*Burkholderia cepacia* komplex), byly popsány i takto vzniklé epidemie mezi CF pacienty [60]. Ve většině CF center je zavedena separace pacientů podle mikrobiologického nálezu [1].

Rizikem v případě infekce Bcc je přirozená rezistence těchto mikroorganismů na celou řadu antibiotik. Vlivem dlouhodobého podávání antibiotik (ceftazidim, piperacilin) dochází ke ztrátě citlivosti a bakteriální kmeny se tak mohou stát rezistentní [1]. Bcc jsou také schopny tvořit exopolysacharid zvaný cepacian podobný alginátu *Pseudomonas aeruginosa* a stejně jako PA jsou schopné vytvářet biofilm [61]. Tvorbou biofilmu se vyznačují zejména *B. multivorans* a *B. cenocepacia* [52]. Celkově lze Bcc označit jako rizikovější a více virulentní než *P. aeruginosa*. Infekce navíc může vykazovat různý průběh od asymptomatické chronické kolonizace po okamžité a náhlé zhoršení stavu a rozvoj pneumonie a sepse - „cepacia syndrom“ [1]. Infekce Bcc je spojena se snížením dlouhodobých šancí na přežití a zhoršení klinického stavu [62]. Pacienti se záchytem tohoto mikroorganismu obvykle nejsou indikováni k transplantaci plic vzhledem ke komplikacím po transplantaci a rizikem rychlé reinfekce brzy po zákroku [1].

1.4.4 Lektiny *Burkholderia cepacia*

Také mikroorganismy z rodu *Burkholderia cepacia* produkují lektiny schopné se vázat na sacharidové struktury v hostitelském organismu. V současné době jsou studovány zejména lektiny *Burkholderia cenocepacia* – BC2L-A a BC2L-C.

BC2L-A je strukturně podobný PA-IIL, vykazuje 32% identity a také koordinuje Ca^{2+} ionty. Tento lektin je specifický vůči mannose resp. oligomannosovým N-glykanům (které se vyskytují v lidských glykoproteinech). Naopak tento lektin neinteraguje s fukosylovanými nebo galactosylovanými povrchy [63], [64].

BC2L-C je označován jako superlektin, který má dvě různé domény s unikátní specifitou a biologickou aktivitou. C-terminální doména vykazuje specifitu vůči mannose a L-glycero-D-manno-heptose a svojí sekvencí je podobná BC2L-A. N-terminální doména je pak podobná TNF- α (TNF- α -like domain) a specifická k fukose resp. fukosylovaným

epitopům determinant lidských krevních skupin (histo-blood group epitopes) – H typ a Lewis b a Lewis Y. Celý protein je pak hexamerní a předpokládá se, že se přes svoji C-terminální doménu specifickou vůči mannose váže na povrch buněk (bakteriálních i savčích) a N-terminální TNF- α -like doména se váže na fukosylované epitopy sacharidové determinanty krevních skupin a je schopna spustit produkci IL-8 a tím stimulovat zánět [65], [66].

Dle uvedených skutečností lze předpokládat, že i v případě *B. cepacia* (resp. *cenocepacia*) hrají lektiny důležitou roli v patogenezi daného mikroorganismu.

1.4.5 Další mikroorganismy

Mezi další mikroorganismy vyskytující se v případě CF patří i *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, netuberkulozní mycobacteria případně *Achromobacter xylosoxidans* či *Stenotrophomonas maltophilia*.

- ***Staphylococcus aureus*** – je gram-positivní bakterie. Běžně se vyskytuje v populaci, zdrojem nákazy tak může být například zdravý přenašeč. Riziko představuje nákaza methicilin-rezistentním *S. aureus* (MRSA) – léčba je komplikována rezistencí na antibiotika běžně používaná proti stafylokokovým infekcím, nutná přísná hygienická opatření proti přenosu a zejména rozšíření mezi pacienty. Byla prokázána vyšší adherence *S. aureus* k epitelálním buňkám respiračního traktu s defektem v CFTR [67].
- ***Achromobacter xylosoxidans*** – je aerobní gram-negativní bakterie, která je oportunním lidským patogenem a může způsobit bakteremii, meningitidu nebo pneumonii zejména u imunokomprimovaných pacientů. U pacientů s CF byla zaznamenána vyšší prevalence izolátů této bakterie a její přetrvávání i přes antibiotickou léčbu. *A. xylosoxidans* je také schopna tvořit biofilm [68], [52].

U zde zmíněných mikroorganismů je jejich vliv a nežádoucí účinky na klinický stav CF pacienta a poškození plic stále studovány, nicméně oproti *P. aeruginosa* a *B. cepacia* komplexu je jejich patogeneze u CF spíše minoritní.

2 Cíl práce

Práce se zaměřuje na prokázání schopnosti slepičích protilátek bránit adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně *in vitro* pro možnost využití slepičích protilátek jako agens pasivní imunizace u pacientů trpících cystickou fibrosou.

Proto konkrétním cílem této práce bylo vypracovat a srovnat různé metody hodnocení adheze *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně a sledovat vliv IgY a dalších vybraných agens na tento proces.

Pro splnění hlavního cíle této práce bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- optimalizovat metodiku adhezních testů pro *in vitro* modelový systém
- vypracovat postupy adhezních testů a porovnat jejich vyhodnocení metodou průtokové cytometrie a duální kvantifikací fluorescence na spektrofotometru
- sledovat vliv vybraných agens zejména slepičích protilátek na adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení

3.1.1 Přístrojové vybavení

analytické váhy 40 SM	PESA, Švýcarsko
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
biohazard box Clean Air Euroflow	Clean Air Technik, Schoeller, ČR
centrifuga Eppendorf 5415 R	Eppendorf, USA
centrifuga Eppendorf 5430	Eppendorf, USA
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Micro Star 12	VWR International, ČR
centrifuga Micro Centaur	Sanyo, UK
CO ₂ inkubátor	ShellLab, ČR
inkubátor s funkcí třepání	New Brunswick Scientific, USA
laminární box MB 120	Labox, ČR
laminární box BIO 126	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U s programem NIS-Elements AR 2.30	
pH metr model HI 2211	Hanna Instruments, ČR
předvážky EW 600	KERN, ČR
sonikátor ELMasonic E 30 H	P-Lab, ČR
spektrofotometr Helios α	ThermoSpectronic, USA
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 PRO	Tecan, Švýcarsko
s programem i-control	
spektrokolorimetr Spekol	Carl-Zeis, Německo
třepačka MiniRocker	Eppendorf, USA
vodní lázeň	Memmert, Německo
zamrazovací box Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene®

3.1.2 Použitý materiál

10 a 50 ml plastové zkumavky	Corning, USA
Ampicilin	Serva, Německo
AquaClean (roztok na desinfekci vody)	Chemos, ČR
azid sodný (NaN_3)	Fluka, Německo
BEGM medium	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
BSA fraction V	Rockland, USA; Merck, USA
Ceftazidim Genim	SVUS Pharma a.s., ČR
CellTracker Green CMFDA	Gibco™ Invitrogen, UK
Cell scraper for tissue culture („škrabky“)	TPP, Švýcarsko
Chloramfenikol	Duchefa, Nizozemsko
Collagen type IV from human placenta (alt. Sigma Collagen VI)	Sigma, USA
Deoxyribonuclease I ex bovine pancreas	Koch-Light Laboratories, UK
destičky CellBind® 6, 12, 24 a 96 jamek	Corning, USA
D-galaktosa	Lachema, ČR
D-glukosa	Lachema, ČR
DMSO (dimethylsulfoxid)	Fluka, Německo
DMSO Cell culture grade	AppliChem GmbH, Německo
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa, 12-14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA
Dulbecco's MEM High Glucose medium	PAA Laboratories, Rakousko
EDTA	Lachema, ČR
FBS	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
FCS (fetal calf serum) Superior	Biochrom AG, Německo
Geneticin	Gibco™ Invitrogen, UK
Gentamicin	Biochrom AG, Německo
Giemsa stain	Fluka, Německo
glycerol	Lachema, ČR
glycin	Lachema, ČR
jednorázové sterilní plastové pipety 1-25 ml	Corning, USA
Kanamycin	Duchefa, Nizozemsko
kryozkumavky	Nunc InterMed, Dánsko; Corning, USA
kultivační lahve 12,5 – 75 cm ²	Chemos, ČR; TPP, Švýcarsko; VWR International, ČR
kyselina citronová	Lachema, ČR
kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
kyselina octová	Lachema, ČR
L-alanin	Lachema, ČR
L-asparagin	Lachema, ČR
L-asparagová kyselina	Lachema, ČR
L-cystein	Lachema, ČR
L-fukosa	Lachema, ČR
L-glutamin (200 mM)	PAA Laboratories, Rakousko
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
L-prolin	Lachema, ČR
Meronem	AstraZeneca, UK
MidiPlus pipetovací nástavec	Biohit, UK

parafilm	Bemis, USA
PBS tablety (tablety pro přípravu pufru – 1 do 500 ml destilované vody)	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
pipety	Biohit, UK
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma, USA
for General Cell Membrane Labeling	
PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma, USA
for General Cell Membrane Labeling	
rukavice bez pudru	Marigold Industrial, UK
solí, etc ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; NaCl ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; NaHCO_3 ; NaOH ; NH_4Cl ; MgCl_2 ; MgSO_4 ; Na_2CO_3)	Lachema, ČR
sterilní filtry 70 μm	Falcon BD, USA
sterilní mikrofiltry 0,22 μm	Corning, USA
špičky	Biohit, UK
TRIS/HCl	Serva, Německo
Triton X-100	Serva, Německo
trypsin (TPCK threated, type XIII Bovine)	Sigma, USA
trypsin-EDTA 10x koncentrovaný roztok	PAA Laboratories, Rakousko
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen	Merck, USA
TWEEN® 20	Fluka, Německo

3.2 Techniky tkáňových kultur

V této práci byly využívány celkem tři buněčné linie. A549 je nádorová linie, linie NuLi-1 jsou imortalizované buňky izolované z plicní tkáně normálního pacienta a linie CuFi-1 jsou imortalizované buňky izolované z plicní tkáně pacienta trpícího cystickou fibrosou (homozygot $\Delta F508$) – detailní popis jednotlivých linií viz. kap. 1.2.2. V případě imortalizovaných linií NuLi-1 a CuFi-1 bylo postupováno podle originálního produktového listu ATCC, který byl dodán spolu s liniemi (viz. Příloha 1). Pro práci s linií A549 bylo využito informací z [69] a [70].

3.2.1 Rozmražení linií

Linie se dlouhodobě uchovávají zamražené v -80°C nebo tekutém dusíku. Jako kryoprotektant se nejčastěji používá dimethylsulfoxid (DMSO), který je pro buňky částečně toxický a při rozmrazování je proto nutné postupovat rychle.

A549 linie

Jak již bylo popsáno v kap. 1.2.2. jedná se nádorovou linii plicního epitelu, jako taková není tato linie náročná na složení media a další kultivační podmínky.

Nejprve bylo připraveno kompletní kultivační medium ve složení: *DMEM*, 10% v/v *FBS*, 2 mM *L-glutamin* a 50 $\mu\text{g/ml}$ *Gentamicin* v požadovaném objemu. Takto připravené medium bylo temperováno na 37°C . Alikvot buněk z -80°C nebo tekutého dusíku byl ihned rozmrazen v temperované vodní lázni (37°C) a poté byly buňky sterilně v laminárním boxu přeneseny do zkumavky Falcon. K buněčné suspenzi bylo postupně po 1 ml přidáno 10 ml kompletního media a následovala centrifugace – 1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320R.

Získaná peleta buněk byla resuspendována v 1 ml media. Z této základní suspenze bylo odebráno 20 μl pro určení počtu buněk a stanovení viability pomocí trypanové modři – viz. kap. 3.2.5. Zbylá část suspenze byla převedena do kultivační lahve o růstové ploše 75 cm^2 naplněné 15 ml kompletního kultivačního media *DMEM*.

Buňky byly kultivovány při 37°C a 5% CO_2 s výměnou media každé 2-3 dny. Při rozmrazení byly nasazovány ve zvýšené hustotě oproti běžné subkultivaci.

NuLi-1, CuFi-1 linie

Jde o imortalizované tkáňové kultury dýchacích cest (plíce, bronchy) izolované ze zdravého (NuLi-1) a CF (CuFi-1) jedince viz. kap. 1.2.2. Tento typ buněk je poměrně citlivý na kultivační podmínky – definovaná media, modifikovaný kultivační povrch.

Pro práci s těmito buňkami bylo používáno medium BEGM nebo LHC-9 s přidavkem Geneticinu ve výsledné koncentraci 50 µg/ml. V prvních krocích bylo postupováno stejně jako v případě linie A549. Rozmrazené alikvoty buněk byly sterilně přeneseny do zkumavek Falcon a postupně bylo ve vzrůstajícím množství vždy po 1 minutě přidáváno temperované medium – definované postupné přídatky media (viz. tab. 3.1.) zajišťují postupnou adaptaci buněk na osmotický tlak a pH.

Tabulka 3.1. Postupné přídatky media u citlivějších buněčných linií.

objem alikvoty buněk [ml]	přídavek media po minutách [ml]									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Následovala centrifugace – 1000 RPM, 5 minut, centrifuga Hettich Universal 320 R. Získaná peleta buněk byla resuspendována v 1 ml media a převedena do kultivační lahve o růstové ploše 25 nebo 75 cm² (v závislosti na objemu a hustotě rozmrazovaného alikvotu, nasazení buněk ve zvýšené hustotě) s povrchem potaženým kolagenem typu IV 60 µg/ml (z lidské placenty, Sigma; viz. kap. 3.2.6) s 10 popř. 15 ml media LHC-9 nebo BEGM s Geneticinem. Opět bylo ze základní suspence buněk odebráno 20 µl pro určení počtu buněk a stanovení viability pomocí trypanové modři.

3.2.2 Kultivace linií

Všechny linie byly kultivovány při 37 °C a 5% CO₂ (inkubátor ShellLab), v místnosti určené speciálně pro práci s tkáňovými kulturami vybavené vodní lázní, laminárními boxy, mikroskopem atd. aby byla minimalizována možnost kontaminace z okolí. Spotřební materiál jako například špičky k pipetám a pufry byly sterilizovány za pomoci autoklávu (standardní program 121 °C, 20 minut).

A549 linie

Jedná se o linii lidských alveolárních bazálních epitheliálních buněk odvozených z adenokarcinomu plic [33]. Buňky této linie byly standardně kultivovány v mediu DMEM („Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“), které obsahuje kromě jiného základní aminokyseliny a vitamíny a jako indikátor změny pH fenolovou červen. Pro zajištění přítomnosti růstových faktorů bylo k základnímu DMEM mediu přidáváno 10% v/v FBS (fetální bovinní sérum), dále 2 mM L-glutamin sloužící buňkám k produkci energie a syntéze nukleových kyselin a proteinů a antibiotika jako prevence bakteriální kontaminace. V našem případě byl používán Gentamicin jakožto antibiotikum účinné proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a mykoplasmě, které je v mediu stabilní delší dobu než Penicilin/Streptomycin [71].

NuLi-1, CuFi-1 linie

Jedná se o bronchiální epitheliální buňky izolované od pacientů, které jsou imortalizované viz. kap. 1.2.2. Buňky se tedy chovají jako linie a neplatí pro ně omezení primárních linií. Tyto linie vyžadují media o specifickém složení s řadou růstových faktorů a media nejsou suplementována fetálním bovinním sérem. Dalším specifikem pěstování těchto buněk je nutnost povrchu potaženého kolagenem – typu IV.

Pro kultivaci linií NuLi-1 a CuFi-1 bylo používáno medium BEGM („Bronchial Epithelial Cell Growth medium) nebo LHC-9, tato media se liší pouze v tom, že LHC-9 již obsahuje růstové faktory, zatímco BEGM je třeba připravit doplněním jednotlivých růstových faktorů do základního BEBM media („Bronchial Epithelial Cell Basal medium). V obou případech je do media přidáván Geneticin (G418), který zde slouží jednak jako antibiotikum a také jako selekční agens geneticky modifikovaných buněk (imortalizace linií) [72]. Buňky byly kultivovány na povrchu potaženém kolagenem typu IV (přesný postup potažení povrchu viz. kap. 3.2.6.), pouze pro provedení adhezních testů byly kultivovány na destičkách Corning CellBind bez potahu kolagenem, tato kultivace byla krátkodobá, což nemá zásadní vliv na vlastnosti buněk [73].

3.2.3 Subkultivace buněk

Subkultivace nebo také „pasáž“ buněk je cílené snížení hustoty buněk v kultivační nádobě a v případě adherentních linií umožňuje nechat buňky narůst pouze do uniformní monovrstvy tzv. „monolayer“. V případě adherentních linií (používaných v tomto projektu) je pro disagregaci buněk používán trypsin s EDTA. Jako inhibitor působení trypsinu se běžně používá fetální bovinní serum. U jednotlivých linií si vedeme evidenci o kolikátou pasáž po rozmražení se jedná.

A549 linie

Před „pasáží“ byly buňky ponechány dorůst do zhruba 90 - 95% konfluence. Poté bylo z kultivační lahve odstraněno kultivační medium, adherovaná mono vrstva buněk byla promyta PBS, aby došlo k odstranění případných zbytků fetálního séra z media, a následně byly buňky převrstveny 1 - 2 ml 0,25% v/v trypsinu s 0,53 mM EDTA v PBS (v závislosti na velikosti kultivační nádoby). Buňky byly s trypsinem inkubovány 5 – 10 minut ve 37°C a působení trypsinu bylo poté zastaveno přidávkem 10 – 50% v/v FBS v závislosti na provedení. Získaná buněčná suspence z kultivační lahve byla převedena do sterilní zkumavky a centrifugována 5 minut při 80 až 120 x g (Hettich Universal, Micro Star). Získaná peleta byla resuspendována v 1 ml kompletního media (viz. výše). Z této suspence byl nasazen alikvot na další kultivaci, další část buněk případně nasazena na CellBind destičky nebo zamražena a 20 µl bylo odebráno na počítání buněk.

NuLi-1, CuFi-1 linie

Z konfluentní vrstvy buněk (asi 90%) bylo odstraněno kultivační medium. Následně byly buňky převrstveny 1 - 3 ml 0,25% v/v trypsinu s 0,53 mM EDTA a inkubovány 5 – 10 minut při 37°C. Lepšího uvolnění buněk bylo v případě nutnosti dosaženo jemným poklepem na kultivační nádobu. Působení trypsinu bylo zastaveno přidáním ekvivalentního objemu (1 – 3 ml) 1% v/v fetálního bovinního sera v PBS. Suspence buněk byla centrifugována 5 minut při 80 – 120 x g (Hettich Universal, Micro Star). Peleta byla poté resuspendována v 1 ml media s přidávkem Geneticinu a stejně jako v případě buněk A549 byl pro další kultivaci odebrán menší alikvot (poměr subkultivace asi 1:5) a dále stejný alikvot na počítání buněk.

U těchto linií je pro zachování standardních vlastností doporučen pouze omezený počet „pasáží“ po rozmražení – 15 „pasáží“.

3.2.4 Kryokonzervace linií

Buněčné linie se dlouhodobě uchovávají zamražené v tekutém dusíku nebo při -80°C . Kromě uchování linie zajišťuje zamražení i genetickou stabilitu a do jisté míry brání změnám fenotypu.

Buňky byly „pasážovány“ jako obvykle (viz. kap. 3.2.3), získaná peleta jednou promyta a opět centrifugována za výše uvedených podmínek. Konečná peleta byla resuspendována v zamrazovacím mediu tvořeném – DMEM (nebo LHC-9/BEGM) medium; 10% v/v FBS (nebo 30% v případě linií NuLi-1, CuFi-1) a 10% v/v DMSO. Buněčná suspence byla alikvotována cca po 1 ml do popsanych kryozkumavek. Poté byly kryozkumavky řádně dotaženy a umístěny do zamrazovacího boxu NalgeneTM Cryo 1°C Freezing Container, který byl umístěn přes noc do -80°C , což zajistilo postupné ochlazování přibližně $1^{\circ}\text{C}/\text{minuta}$.

O zamrazování byla vedena evidence.

3.2.5 Stanovení počtu buněk

Pro řadu experimentů a postupů je třeba určit počet buněk v suspensi. K počítání buněk byla využívána Bürkerova komůrka (někdy nazývána hemocytometr) a mikroskop Motic.

Buněčná suspence získaná z „pasáže“ (peleta po centrifugaci resuspendovaná v 1 ml media) byla 1:1 smíchána s 0,4 % w/v trypanovou modří pro vizualizaci mrtvých buněk (20 μl buněčné suspence a 20 μl trypanové modří). Takto získaná suspence byla pipetována na mřížku Bürkerovy komůrky a ta byla umístěna pod mikroskop. Počítán byl 1 velký čtverec (4x4 malé, počítána vždy jen horní a pravá strana, aby nebyly některé buňky počítány dvakrát). Mrtvé buňky (modře obarvené) nejsou zahrnuty do konečného počtu. Počet buněk na mililitr n získáme ze vztahu:

$$n = \text{počet buněk ve velkém čtverci} \times 10\,000 \times \text{ředění}$$

3.2.6 Příprava kultivačních nádob s kolagenem

Linie NuLi-1 a CuFi-1 vyžadují kultivaci na povrchu, který je potažen kolagenem typu IV z lidské placenty (může být také označen jako Sigma Collagen VI). Pro postup přípravy potahovaných nádob bylo využito informací z produktového listu kolagenu a produktových materiálů od ATCC k liniím NuLi-1 a CuFi-1.

Nejprve byl připraven zásobní roztok kolagenu v 0,25% v/v kyselině octové o koncentraci 1,8 mg/ml. Tento zásobní roztok byl uchováván v chladu ve skleněné lahvičce. Pro přípravu kultivačních lahví s kolagenovým povrchem byl používán roztok kolagenu o koncentraci 60 µg/ml připravený ze zásobního roztoku naředěním do destilované vody nebo PBS a přefiltrován přes sterilní 0,22 µm filtr (Corning).

Do kultivačních nádob s povrchem 25 a 75 cm² bylo pipetováno 2 resp. 5 ml pracovního roztoku kolagenu o koncentraci 60 µg/ml a inkubace na povrchu (nutno dbát na rovnoměrné a úplné pokrytí povrchu kultivační lahve roztokem kolagenu) lahví probíhala nejméně 18 hodin. Poté byl roztok kolagenu odebrán, nádoby ponechány vyschnout a následně byly 2 – 3 x promyty PBS. Nakonec byly lahve sterilizovány UV zářením nejméně 3 hodiny (pokud je možno, přes noc) a uzávěry byly překryty parafilmem. Připravené kultivační lahve byly do použití uchovávány v chladu.

3.3 Izolace buněk dýchacích cest metodou „brushing“

Jedná se o poměrně šetrnou metodu získání epiteliálních buněk dýchacích cest, kdy jsou buňky zachyceny na speciální kartáček během bronchoskopického vyšetření pacienta, odtud název „brushing“ [74]. Odběr buněk byl proveden ve FN Motol.

Kartáček se zachycenými buňkami byl vložen do media LHC-9 s přídavkem 10 % v/v FBS. Takto získaná buněčná suspence byla uchovávána v chladu. Následně byl ke vzorku přidán roztok DNasy I (50 µg/ml, PBS) pro uvolnění buněk zachycených v hleny. Inkubace s DNasou I probíhala 10 minut na ledu. Poté byla suspence filtrována přes mikrofiltr o porozitě 70 µm (BD, Falcon). Dalším krokem byla centrifugace 10 minut při 2000 RPM (MicroCentaur). Získaná peleta byla resuspendována v 400 µl LHC-9 media. Alikvot ze suspence (10 µl) byl odebrán pro kontrolní roztěr na mikroskopické sklíčko, kde byla suspence fixována 10 % v/v formaldehydem a následně nabarvena 0,1-0,5 % w/v roztokem

barvy Giemsa. Kromě toho byla také mikroskopicky stanovena viabilita získaných buněk pomocí trypanové modři – k 10 µl buněčné suspence bylo přidáno 1 µl 0,4 % w/v roztoku trypanové modři. Získané buňky byly kultivovány v mediu LHC-9 s antibiotiky.

3.4 Práce s *Pseudomonas aeruginosa*

V této práci byly k dispozici následující kmeny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* z Ústavu lékařské mikrobiologie FN Motol:

- PA K – sbírkový kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*;
- PA – sbírkový kmen mukoidní formy *Pseudomonas aeruginosa*;
- PA CF – kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF

Pro optimalizace metod byl využíván kmen PAK, který je dobře definovaný a poskytuje reprodukovatelné výsledky.

3.4.1 Kultivace *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly kultivovány v kapalných médiích při 37°C za konstantního třepání na střední otáčky v inkubátoru New Brunswick. Pro kultivaci byly využívány 2 typy medií. Jednalo se o medium s optimálním složením označované jako PS (dále v textu případně označené jako plné nebo klasické), a také medium minimální označované jako M9. Při kultivaci v minimálním mediu M9 dochází u bakterie ke stimulaci tvorby lektinu PA-IIL [75]. Složení jednotlivých medií je následující:

PS médium: 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂; 0,5% (v/v) glycerol; (sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C)

M9 minimální médium: 16,8 mM Na₂HPO₄; 22 mM KH₂PO₄; 5 mM NaCl; 49 mM NH₄Cl; (sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C); 2 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,2 % (w/v) glukosa; (sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm)

V případě kultivace v M9 byla z kryokonzervy PA přenesena do 1 – 2 ml Ps media a ponechána narůst při 37°C a středních otáčkách třepání asi 2 hodiny, následně byla tato suspenze inokulována přibližně do 15 ml media M9 a ponechána růst přes noc při 37 °C a středních otáčkách třepání. Dále bylo s PA pěstovanou v M9 postupováno shodně jako v případě PA kultivované v Ps mediu, příprava bakterií pro adhezní testy viz kap. 3.6.1.

Pro dlouhodobé uchování byly bakterie zamrazeny následujícím postupem: namnožené bakterie v PS mediu byly alikvotovány po 100 µl do mikrozkušavek eppendorf. K bakteriální suspensi bylo přidáno 100 µl kryoprezervačního media (složení: 40% (w/v) glycerol v PBS-ELISA; sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm). Následovalo rychlé zamrazení v tekutém dusíku a poté byly kultury uchovávány při -80°C.

Koncentrace bakteriálních buněk v suspensi byla určována pomocí měření absorbance (optické denzity) při 600 nm (na spektrofotometru Spekol). Pro výpočet koncentrace slouží převodní vztah [76] :

$$CFU = A_{600} \cdot 10^8$$

CFU koncentrace bakterií v b/ml (z angl. Colony-forming Units)

A_{600} absorbance při 600 nm

3.5 Fluorescenční značení buněk

Pro studium adheze bakterií na buňky plicního epitelu byly hledány možnosti objektivního vyhodnocení nejen na základě mikroskopie. Jednou z vhodných metod je fluorescenční značení bakterií a epiteliálních buněk a následná duálné kvantifikace fluorescence. Pro fluorescenční značení bylo využito fluorescenčních sloučenin které zachovají i po označení plicní buňky i bakterie *P. aeruginosa* životaschopné a bez modifikované povrchové struktury, což má pro adhezní testy zásadní význam.

3.5.1 Značení bakterií pomocí PKH 26

PKH 26 je fluorescenční sloučenina, která se váže do membrány buněk za pomoci delšího alifatického řetězce. Jedná se o patentem chráněný produkt, detaily o struktuře a mechanismu jsou omezeně dostupné. Excitační maximum má tato sloučenina při 551 nm, emisní pak při 567 nm. Postupováno bylo podle doporučeného návodu výrobce, pouze doba inkubace bakterií s fluorescenčním barvivem byla optimalizována.

Kultivované bakterie *P. aeruginosa* byly centrifugačně promyty od media za použití PBS. Následně byla připravena bakteriální suspence v Diluentu C o koncentraci $6 \cdot 10^8$ b/ml. Ke 250 μ l bakteriální suspence bylo přidáno 250 μ l barviva v Diluentu C (20 nebo 40 μ M). Získaná reakční směs byla dobře promíchána a inkubována za laboratorní teploty 30 minut za občasného promíchání. Po inkubaci byla reakce zastavena přidávkem 100 μ l 1% w/v BSA. Po prvním přidavku BSA a krátké inkubaci bylo přidáno ještě 1,2 ml BSA, směs byla poté centrifugována 10 minut při 13 000RPM (MicroCentaur, Eppendorf 5415R). Pelety byly poté resuspendovány v PBS a ještě jednou promyty. Úspěšnost značení byla zkontrolována mikroskopicky s využitím fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31002 RdiI C87702).

Pro vyhodnocení adhezních testů byla fluorescence značených bakterií měřena i na spektrofleurimetru Tecan Infinite M200 Pro. Pro tato měření byly optimalizovány excitační a emisní vlnové délky. Měření byla prováděna pro excitaci při 522 nm a pro emisi při 569 nm, při spodním čtení destičky.

V případě sledování na průtokovém cytometru Canto II byla fluorescence *P. aeruginosa* sledována na kanálech FL 3 a FL 4.

3.5.2 Značení plicních buněk pomocí PKH 67

Jedná se o fluorescenční barvivo, které se váže do membrány buněk podobně jako PKH 26. PKH 67 má excitační maximum při 490 nm a emisní při 502 nm. Jedná se o fluorescenci v zelené oblasti spektra. Postupováno bylo podle doporučení výrobce (Sigma).

Adherentní linie používané v této práci byly před vlastním značením „pasážovány“, protože je třeba pracovat s buněčnou suspensí. Buněčná suspence byla jednou centrifugačně promyta PBS a peleta byla poté resuspendována v Diluentu C (250 – 500 μ l

v závislosti na množství buněk). K buněčné suspensi v Diluentu C bylo přidáno stejné množství (250 – 500 μ l) fluorescenčního barviva v Diluentu C o koncentraci 2 – 4 μ M. Takto získaná reakční směs byla dobře promíchána a inkubována 4 – 5 minut. Následně bylo značení zastaveno přidavkem 1 ml FBS. Poté byla suspence centrifugována 10 minut při 1000 RPM (Hettich Universal 320 R) a získaná peleta resuspendována v 5 ml kompletního media pro daný typ buněk (DMEM/A549 nebo LHC-9, BEGM/NuLi-1, CuFi-1). Značené buňky byly ještě 2x centrifugačně (5 minut, 1000 RPM, Hettich Universal) promyty kompletním mediem a fluorescence poté zkontrolována na mikroskopu Nikon-Eclipse (filtr 31001 FITC C87701). Buňky vykazovaly fluorescenci i po adherenci na povrch kultivační nádoby a to po dobu nejméně 7 dnů, což je v souladu s parametry výrobce, který udává přetrvání fluorescence nejméně 10-12 dnů.

Fluorescence značených buněk byla sledována i na spektrofleurimetru Tecan Infinite M200 Pro a to při vlnových délkách 470 nm/ 505 nm při spodním čtení destičky. V případě měření na průtokovém cytometru Canto II byla fluorescence takto značených buněk sledována na kanále FL 1.

3.5.3 Značení plicních buněk pomocí CellTracker

Reagencie CellTracker má poměrně široké spektrum aplikací, označené buňky jsou životaschopné a jejich fluorescence přetrvává 2-5 dní. Buňky je možné značit i adherované na povrchu kultivačních nádob. Tato sloučenina vykazuje fluorescenci v zelené části spektra s excitačním maximem při 492 nm a emisním pak při 517 nm.

Buňky byly kultivovány za výše uvedených podmínek na destičkách vhodných k použití ve spektrofleurimetru – CellBind 6, 12 a zejména 24 jamek. Po dosažení konfluence byly buňky promyty od media pomocí PBS a převrstveny pracovním roztokem CellTrackeru v PBS. Byly testovány 2 koncentrace pracovního roztoku – 5 a 10 μ M a vzhledem k nepatrným rozdílům v kvalitě a intenzitě fluorescence byla používána nižší koncentrace. Inkubace s barvivem byla 30 minut při 37°C, na jednu jamku bylo pipetováno 100 - 500 μ l pracovního roztoku barviva CT (v závislosti na velikosti jamky a tedy i počtu buněk). Po inkubaci byl roztok barviva odpipetován a k buňkám bylo přidáno nové, vytemperované (37°C) kultivační medium (bez přidavku FCS v případě buněk A549,

zbývající linie byly kultivovány v bezsérových mediích). S médiem byly buňky inkubovány 30 minut a poté byly jednou promyty PBS. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky i pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro.

3.6 Interakce buněk plicní tkáně s bakteriemi

V této práci byla studována adheze oportunního lidského patogenu *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu a vliv vybraných agens (slepičí protilátky proti lektinu PA-III, L-fukosa, etc.) na tuto interakci. Metodika a podmínky provedení adhezních testů byly optimalizovány. Dále bylo srovnáno možné vyhodnocení za pomoci kvantifikace fluorescence. Bylo využito informací z [70], dále pak [77] a [78].

Adheze bakterie *P. aeruginosa* byla sledována v modelovém systému epiteliálních buněk dýchacích cest. Pro optimalizaci metody a dílčích kroků byly používány buňky linie A549, poté již bylo využito linií NuLi-1 a CuFi-1 jakožto relevantního modelu pro studium cystické fibrosy. CuFi-1 linie jsou CF buňky s nejvíce zastoupenou mutací CFTR ($\Delta F508$ homozygot) a k tomu byla k dispozici stejně připravená linie zdravých buněk NuLi-1.

Pro objektivní kvantifikaci byly obě komponenty modelového systému – plicní buňky i *P. aeruginosa*, fluorescenčně značeny PKH 67, Cell Tracker Green CMFDA resp. PKH 26 (viz. kap. 3.5).

3.6.1 Adhezní test

Plicní buňky byly po fluorescenčním označení spočítány a nasazeny na destičku Cell Bind – 24 jamek. Pro rovnoměrné pokrytí jedné jamky bylo třeba nasadit přibližně $5 \cdot 10^5$ b/jamka. Na destičce CellBind byly buňky v mediu při 37°C a 5% CO₂ ponechány jeden až dva dny pro vytvoření souvislé adherentní vrstvy („monolayer“) a obnovení po „pasáži“ a značení. Kromě linie plicních buněk byly namnoženy i bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které byly fluorescenčně značeny v den provedení adhezního testu. Po označení byla změřena optická denzita při 600 nm pro stanovení koncentrace *P. aeruginosa* v suspensi.

Následně byly připraveny jednotlivé roztoky fluorescenčně značené *P. aeruginosa* se sledovanými agens, kde koncentrace bakterií byla 1:100 vzhledem k epitelálním buňkám – tedy řádově $5 \cdot 10^7$ b/ml. Složení suspensí bylo následující:

- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^7$ b/ml v PBS pufru
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^6$ b/ml v PBS pufru
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^5$ b/ml v PBS pufru
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^7$ b/ml s 1% w/v L-fukosou v PBS
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^7$ b/ml s 1% w/v D-galaktosu v PBS
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^7$ b/ml s kontrolní protilátkou 4K o koncentraci 1 mg/ml v PBS
- *P. aeruginosa* – $5 \cdot 10^7$ b/ml s protilátkou 4S specifickou proti PA-IIL o koncentraci 1 mg/ml v PBS

Používány byly slepičí protilátky IgY proti lektinu *P. aeruginosa* PA-IIL – kontrolní, kdy zvíře nebylo imunizováno a specifická po imunizaci. Před použitím v adhezním testu byly protilátky dialyzovány proti PBS (více než 24 hodin, 2x 1 l PBS) pro odstranění uchovávacího pufru s azidem.

Jednotlivé suspence (výše uvedené suspence *P. aeruginosa*) byly pipetovány v množství 300 μ l/jamka na destičku s fluorescenčně značenými plicními buňkami. Inkubace plicních buněk s *P. aeruginosa* byla optimalizována - zkoušeny byly časy 30, 60, 90 a 120 minut, a probíhala za laboratorní teploty. Jednotlivé jamky byly po přidání značené *P. aeruginosa* měřeny na spektrofleurimetru Tecan Infinite M200 Pro v programu i-control s Ex/Em vlnovými délkami 470 nm/505 nm pro PKH 67 (plicní buňky) a 522 nm /569 nm pro PKH 26 (*P. aeruginosa*), se spodním čtením destičky. Fluorescenční značení plicních buněk pomocí CellTracker Green CMFDA nebylo dále v adhezních testech používáno z důvodu překryvu emisí fluorescence se značenými bakteriemi.

Po 2 h inkubace byla opět celá destička změřena na spektrofleurimetru Tecan Infinite se stejným nastavením. Poté byly jamky důkladně 3 x promyty PBS pro odstranění volných *P. aeruginosa* a celá destička byla opět změřena na spektrofleurimetru Tecan Infinite pro kvantifikaci buněk a *P. aeruginosa* na plicních buňkách.

Jamky byly také vyhodnoceny mikroskopicky za použití mikroskopu Nikon-Eclipse s programem NIS-Elements a pozorování byla fotograficky zdokumentována.

3.6.2 Adhezní test s využitím průtokové cytometrie

Jako další způsob vyhodnocení adhezních testů kromě spektrofluorimetrie a mikroskopie se jeví průtoková cytometrie. Pro tento případ se uspořádání adhezního testu liší oproti kap. 3.6.1. což je dáno i charakteristikou metody průtokové cytometrie.

Průtoková cytometrie umožňuje analýzu buněk v suspensi na základě řady parametrů (viz. dále). Přetlakem dojde k nasátí suspence do kapiláry, kde je tak vytvořen tenký proud v němž jsou jednotlivé buňky uspořádány těsně za sebou a nesený kapalinou. Tento proud protíná laserový paprsek. Buňky (částice) v suspensi způsobí, že laserové světlo se od nich „odrazí“ (v závislosti na granularitě) a rozptýlí (tím více, čím je částice větší), uplatňuje se Tyndallův jev. U každé buňky jsou pomocí detektorů zaznamenávány 2 hlavní parametry:

SSc (= side scatter) - „odražené“ světlo

FSc (= forward scatter) – vyjadřuje rozptýl

Základními parametry v průtokové cytometrii charakterizujícími detegované částice („události“ - z angl. events) jsou právě FSc a Ssc, které charakterizují velikost resp. granulositu (vnitřní strukturu) částic. Tyto parametry se graficky vyjadřují v podobě histogramů, které jsou jedno- či více vrcholové. Dále jsou používány dvourozměrné grafy (angl. dot plot, český ekvivalent se obvykle nepoužívá), kdy se proti sobě vynášejí 2 různé parametry. Přesnější odhad počtu částic poskytuje plocha histogramu (integrál) – FSC-A, resp. SSC-A. Je možné stanovit a využít v analýze i výšku vrcholu histogramu – FSC-H, SSC-H (z angl. Height), nebo jeho šířku (angl. Width) - FSC-W, SSC-W [79].

U detegovaných částic lze stanovit jejich intenzita fluorescence, a to v různých kanálech v závislosti na excitaci a emisi. U použitého průtokového cytometru Canto II jsou 3 excitační lasery s vlnovou délkou 405 nm, 488 nm a 633 nm a 8 detektorů (emisních kanálů – FL1-8). U nich se opět nejčastěji hodnotí plocha – Flx-A. V histogramech či „dot plot“ grafech lze vybrat různé populace částic (P) podle zvolených kritérií – angl. gate. Český ekvivalent slova „gate“ - brána se v tomto kontextu nepoužívá, obvykle se ponechává anglické označení [79].

Adhezní test byl v tomto případě v některých bodech upraven oproti postupu popsáném v kap. 3.6.1.

Pro stanovení na průtokovém cytometru není nutné fluorescenční označení plicních buněk, protože jejich stanovení je možné na základě jejich morfologie. Plicní buňky byly pasážovány a spočítány, následně nanесeny na destičku CellBind v množství obdobném jako v kap. 3.6.1. tedy $5 \cdot 10^5$ b/jamka a ponechány adherovat nejméně jeden den. Následně byly připraveny fluorescenčně značené *P. aeruginosa*, které byly nanесeny na plicní buňky ve větším množství – poměr buněk a bakterií byl 1:200. Inkubace bakterií na plicních buňkách byla 2h za laboratorní teploty. Poté byly jamky 3x promyty PBS a buňky mechanicky uvolněny za pomoci speciální „škrabky“ určené pro tkáňové kultury a tak převedeny do suspence v PBS, která byla následně analyzována na průtokovém cytometru pro stanovení navázaných bakteriálních buněk na buňky plicní. Trypsinizace jakožto způsob převedení buněk do suspence byla zkoušena také, v tomto případě se ovšem předpokládá uvolnění adherovaných bakterií z buněk působením trypsinu. Fluorescence *P. aeruginosa* značených pomocí PKH 26 byla sledována na kanále FL 3 popř. doplňkově v FL 4.

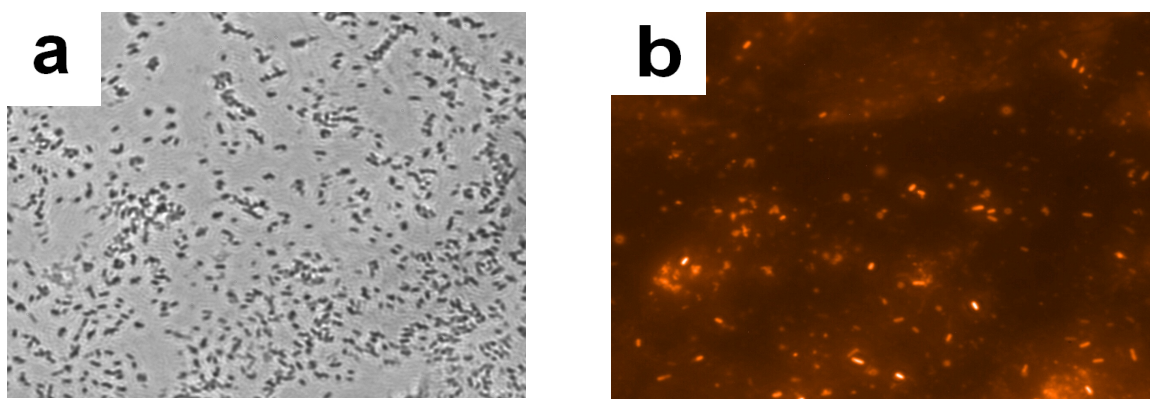
Veškerá měření byla provedena na průtokovém cytometru Canto II s Diva software na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK ve spolupráci s MUDr. Zorou Mělkovou Ph.D.

4 Výsledky

4.1 Fluorescenční značení *Pseudomonas aeruginosa*

PKH 26 je fluorescenční barvivo, které se váže do membrány buněk. Excitační resp. emisní maximum vykazuje tato sloučenina při 551 nm resp. při 567 nm. Klíčovou vlastností pro použití při studiu adheze bakterií *P. aeruginosa* je fakt, že po označení nedochází k modifikaci povrchových struktur mikroorganismu a bakterie jsou plně životaschopné.

Optimalizace fluorescenčního značení byla provedena v bakalářské práci [39]. Inkubace bakterií v Diluentu C probíhala s 20 μ M PKH 26 po dobu 30 minut za laboratorní teploty za občasného promíchání. Reakce byla zastavena 1% BSA v PBS a bakterie byly následně promyty (viz. kap. 3.5.1). Takto byla získána základní suspence bakterií v 1 ml PBS u které byla změřena optická denzita při 600 nm pro zjištění koncentrace *P. aeruginosa*. Mikroskopické zhodnocení probíhalo na mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31002 RdiI C87702) - roztěrem malého množství bakteriální suspence na podložní sklíčko, nebo přímo v suspensi nanesené na destičky CellBind – 24 jamek byla stanovena úspěšnost značení bakterií. Vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu je uvedeno na obrázku 4.1. Fluorescence značených *P. aeruginosa* byla kvantifikována na spektrofotometru Tecan Infinite. Použit byl kmen PA K (kontrolní kmen, viz. kap. 3.4).



Obr. 4.1 *P. aeruginosa* značená pomocí PKH 26. a – ukazuje nativní snímek; b – odpovídá fluorescenčnímu značení. (Nikon Eclipse 1500x, filtr 31002 RdiI)

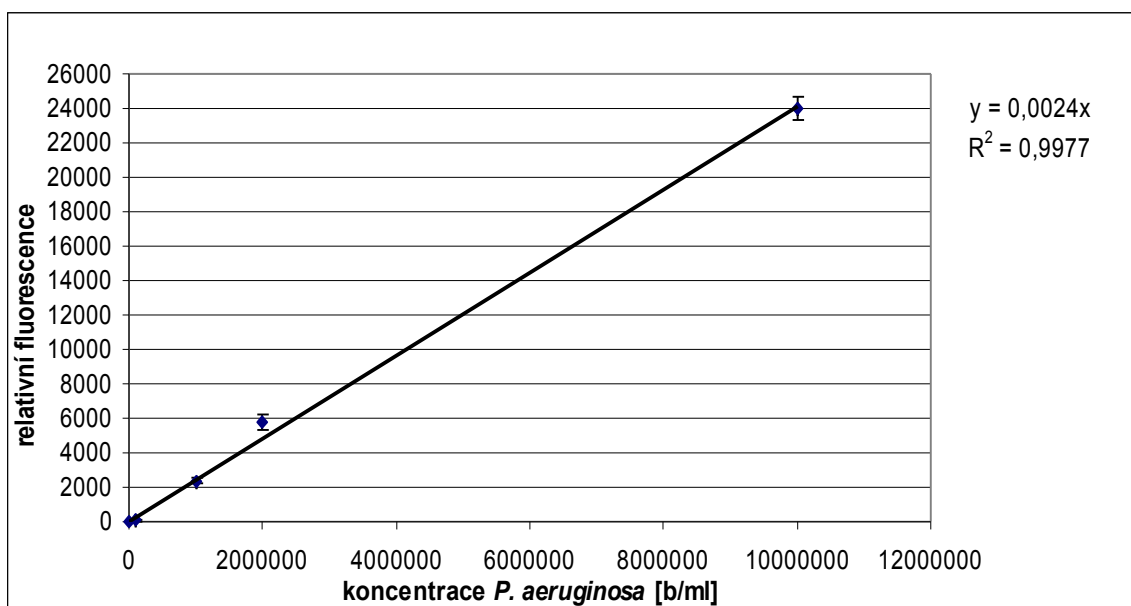
Nastavení spektrofleurimetru pro *P. aeruginosa* bylo optimalizováno a následně byla naměřena kalibrační křivka závislosti fluorescence na koncentraci bakterií. Ze základní bakteriální suspence o známé OD_{600} byla ředěním připravena koncentrační řada a jednotlivé roztoky byly nanесeny na 24 – jamkovou destičku CellBind v objemu 300 μ l/jamka. Destička byla poté změřena na spektrofleurimetru. Jako slepý vzorek (blank) bylo použito PBS. Získaná data jsou uvedena v tabulce 4.1 a kalibrační křivka na obr. 4.2. Jako hraniční koncentrace ještě odlišitelná od signálu slepého vzorku byla na základě měření stanovena koncentrace *P. aeruginosa* $1 \cdot 10^5$ b/ml, tato hodnota je v souladu také s pozorováním na mikroskopu Nikon Eclipse.

Pro měření bylo po optimalizaci dále používáno následující nastavení: excitační vlnová délka 522 nm; emisní vlnová délka 569 nm; „gain“ 160, čtení destičky zespodu.

Tabulka 4.1. Fluoresce *P. aeruginosa* značené PKH 26.

počet buněk v suspensi	Fluorescence bez odečtu pozadí	Fluorescence po odečtu pozadí (relativní fluorescence)	Směrodatná odchylka
$1 \cdot 10^7$	28141,0	23974,0	662,6
$2 \cdot 10^6$	9933,3	5766,3	405,0
$1 \cdot 10^6$	6527,0	2360,0	187,6
$1 \cdot 10^5$	4276,3	109,3	55,0
PBS	4167,0	0,0	0,0

Pozadí (slepý vzorek) – PBS, Tecan Infinite – 522 nm/ 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení.



Obr. 4.2 Závislost fluorescence *P.aeruginosa* na koncentraci bakteriální suspence. Kalibrační křivka fluorescence PA. Tecan Infinite 522 nm/569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, pro tvorbu grafu použity hodnoty po odečtení pozadí.

4.2 Fluorescenční značení buněk plicního epitelu

Pro vyhodnocení interakce *P. aeruginosa* s buňkami plicní tkáně je třeba kvantifikovat obě složky systému. V našem případě byla používána duální fluorescenční kvantifikace. Protože *P. aeruginosa* poskytuje fluorescenci v oranžovo-červené části spektra byly buňky plicní tkáně značeny sloučeninami poskytujícími fluorescenci v zelené oblasti spektra. Používán byl jednak CellTracker Green CMFDA a také PKH 67.

4.2.1 Fluorescenční značení pomocí CellTracker Green CMFDA

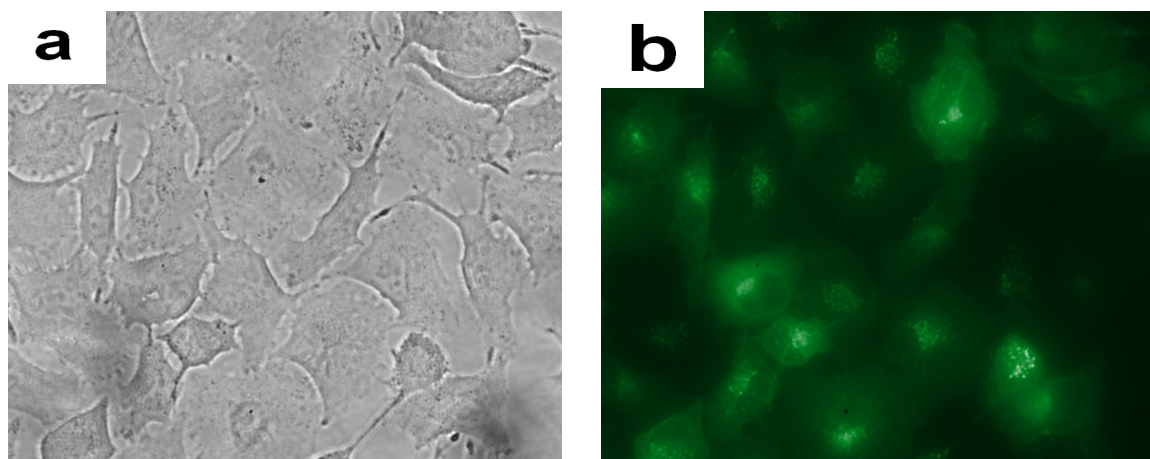
CellTracker Green CMFDA je sloučenina vykazující excitační maximum při 492 nm a emisní při 517 nm. Tato sloučenina umožňuje značení již adherovaných buněk. Buňky plicní tkáně byly převedeny na 24-jamkové destičky CellBind a kultivovány do dosažení konfluence. Značením (postup popsán v kap. 3.5.3) získaná fluorescence buněk byla vyhodnocena pomocí mikroskopu Nikon Eclipse a spektrofluorimetru Tecan Infinite. V případě sledování interakce buněk plicní tkáně a *P. aeruginosa* na spektrofluorimetru docházelo k poměrně výrazné interferenci obou fluorescencí. Interference byla pozorována při použití nižší koncentrace barviva – 5 μM . Tento jev byl pozorován v malé míře i na mikroskopu, z tohoto důvodu nebylo značení linií plicních buněk touto sloučeninou dále používáno.

4.2.2 Fluorescenční značení A549 pomocí PKH 67

Jako další sloučenina byla pro fluorescenční značení linií plicních buněk byla zkoušena sloučenina PKH 67, která je mechanismem podobná PKH 26 a na rozdíl od CellTrackeru má excitační / emisní maximum více posunuté od PKH 26, kterým byly značeny *P. aeruginosa* a nedochází tak k interferenci při současném měření.

Pro značení pomocí PKH 67 je nutná suspence buněk, u linií tedy byl nejprve proveden krok subkultivace („pasáž“). Používán byl roztok barviva o koncentraci 2 nebo 4 μM v Diluentu C v závislosti na množství buněk, přesný postup značení viz. kap. 3.5.2. Po označení byly buňky převedeny do 1 ml média a u takto získané základní suspence byl určen počet buněk za pomoci Bürkerovy komůrky (hemocytometr). Ze základní suspence bylo do jednotlivých jamek (24 – jamkové) destičky CellBind pipetováno takové množství

buněk, aby bylo dosaženo různé koncentrace na jamku pro sestrojení kalibrační křivky. Buňky byly převrstveny 750 µl kompletního media (DMEM, 10% FBS, glutamin, Gentamicin) a ponechány adherovat přes noc v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Jako optimální množství buněk na jamku pro tvorbu konfluentní vrstvy bylo bráno pro další experimenty množství inokula řádově 5.10⁵ buněk/jamka. Fluorescence byla hodnocena mikroskopicky i na spektrofotometru Tecan Infinite. Z měření na spektrofotometru byla sestrojena kalibrační křivka, pro možnost využití v adhezních testech. Jako slepý vzorek („blank“) bylo použito PBS. Vyhodnocení fluorescence za pomoci mikroskopu je uvedeno na obrázku 4.3, spektrofotometrická měření jsou pak shrnuta v tabulce 4.2 a kalibrační křivka pak uvedena na obrázku 4.4.

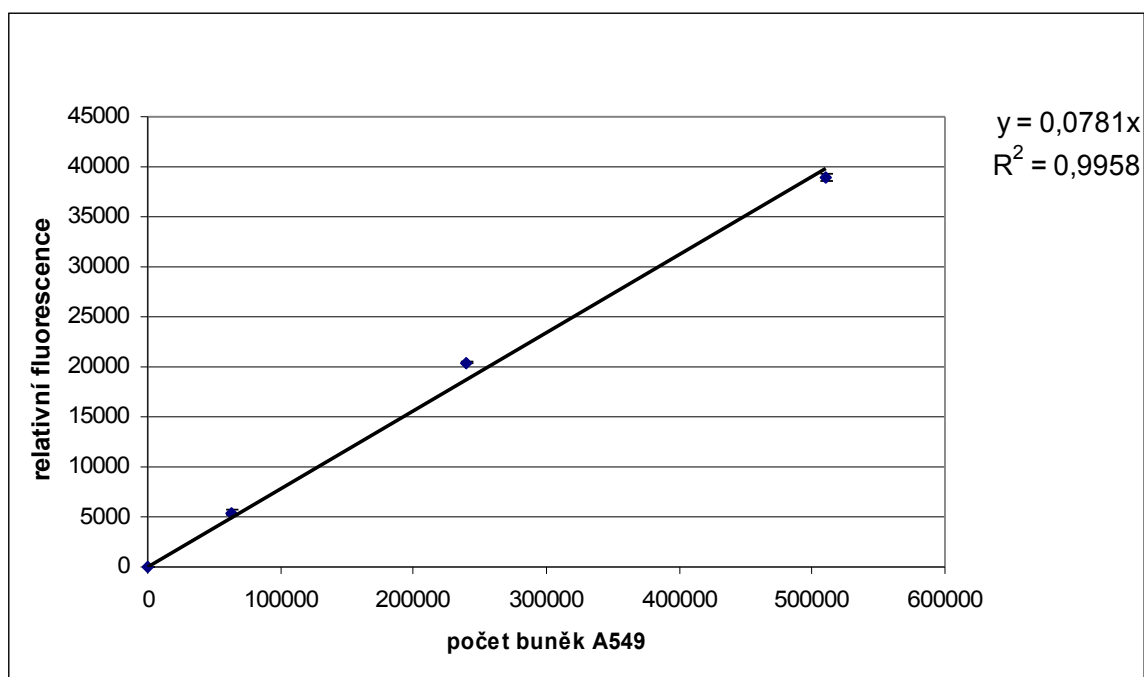


Obr. 4.3 Linie A549 značená pomocí PKH 67. a – odpovídá nativnímu snímku; b – zachycuje fluorescenci. (Nikon Eclipse, 1500x, filtr 31001 FITC)

Tabulka 4.2 Fluorescence linie A549 značené PKH 67. Závislost fluorescence na koncentraci buněk.

počet buněk / jamka	Fluorescence (bez odečtu pozadí)	Relativní fluorescence (odečet pozadí)	Směrodatná odchylka
PBS (pozadí)	10466,5	0,0	0,0
$6.3 \cdot 10^4$	15898,7	5432,2	290,3
$2,4 \cdot 10^5$	30889,7	20423,2	122,3
$5,1 \cdot 10^5$	49430,8	38964,2	328,1

Data ze spektrofleurimetru použita pro tvorbu kalibrační křivky závislosti fluorescence na počtu buněk. Pozadí – PBS; Tecan Infinite, nastavení pro PKH 67: 470 nm/505 nm, „gain“ 160, spodní čtení destičky.



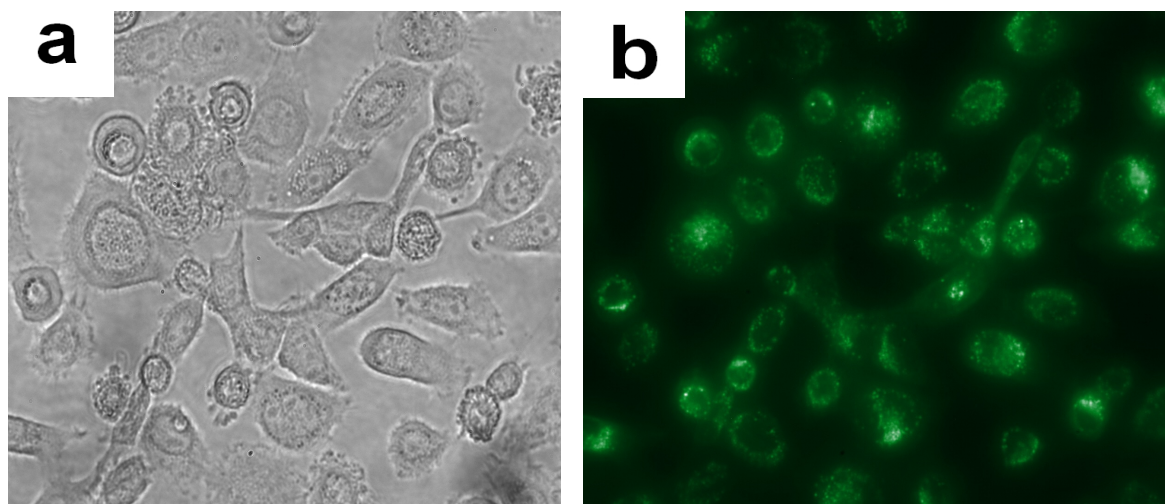
Obr. 4.4 Závislost fluorescence buněk A549 značených PKH 67 na jejich počtu. Kalibrační křivka fluorescence. Tecan Infinite 470 nm/505 nm, „gain“ 160, spodní čtení, pro tvorbu grafu použity hodnoty po odečtení pozadí.

4.2.3 Fluorescenční značení NuLi-1 a CuFi-1 pomocí PKH 67

Pro adhezní testy jsou linie NuLi-1 a CuFi-1 klíčové, pro jejich kvantifikaci je také nutné fluorescenční značení. Po optimalizaci na linii A549 byly i tyto buňky značeny pomocí PKH 67, přesný postup viz. kap. 3.5.2. Všechna nastavení a postupy jsou shodné pro linii NuLi-1 i CuFi-1.

Základní postup byl shodný s linií A549. Po označení byly buňky převedeny do 1 ml media (LHC-9 s Geneticinem) a z této základní suspence byl odebrán alikvot 20 μ l pro určení počtu buněk v suspensi pomocí Bürkerovy komůrky. Ze základní suspence bylo pipetováno takové množství na jednotlivé jamky pro stanovení závislosti fluorescence na počtu buněk, aby výsledné množství buněk na jamkách bylo řádově $10^4 - 10^6$ buněk/jamka. Pro optimální pokrytí jamky a dosažení konfluence je třeba inokula přibližně $5,5 \cdot 10^5$ buněk/jamka. Jako slepý vzorek („blank“) bylo používáno PBS.

Fluorescence byla vyhodnocena na spektrofleurimetru Tecan Infinite. Pro kontrolu byla fluorescence značených buněk hodnocena i na mikroskopu Nikon Eclipse, která je zachycena na obrázku 4.5. Naměřená data ze spektrofleurimetru jsou uvedena v tabulce 4.3 pro linii NuLi-1 a v tabulce 4.4 pro linii CuFi-1. Z naměřených dat byl sestrojen graf závislosti fluorescence na počtu buněk, který je uveden na obrázku 4.6 pro linii NuLi-1 a 4.7 pro linii CuFi-1.

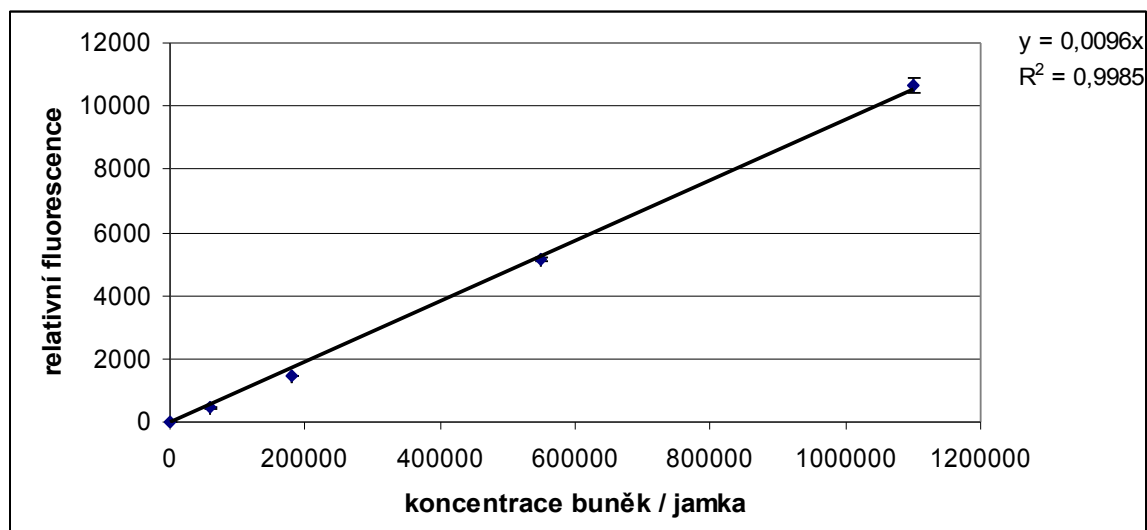


Obr. 4.5 Linie CuFi-1 značená pomocí PKH 67. a – nativní snímek; b – zachycuje fluorescenci (Nikon Eclipse 1500x, filtr 31001 FITC)

Tabulka 4.3 Fluorescence linie NuLi-1 značené PKH 67, závislost fluorescence na koncentraci buněk. Data použitá pro tvorbu kalibrační křivky.

počet buněk / jamka	Fluorescence (bez odečtu pozadí)	Relativní fluorescence (po odečtu pozadí)	Směrodatná odchylka
PBS	2897,3	0,0	0,0
$6,0 \cdot 10^4$	3350,7	453,4	43,2
$1,8 \cdot 10^5$	4352,0	1454,8	15,1
$5,5 \cdot 10^5$	8038,0	5140,8	47,1
$1,1 \cdot 10^6$	13557,3	10660,1	246,6

Data ze spektrofotometru pro tvorbu kalibrační křivky. Pozadí – PBS, Tecan Infinite nastavení pro PKH 67: 470 nm/505 nm, „gain“ 135, spodní čtení destičky.

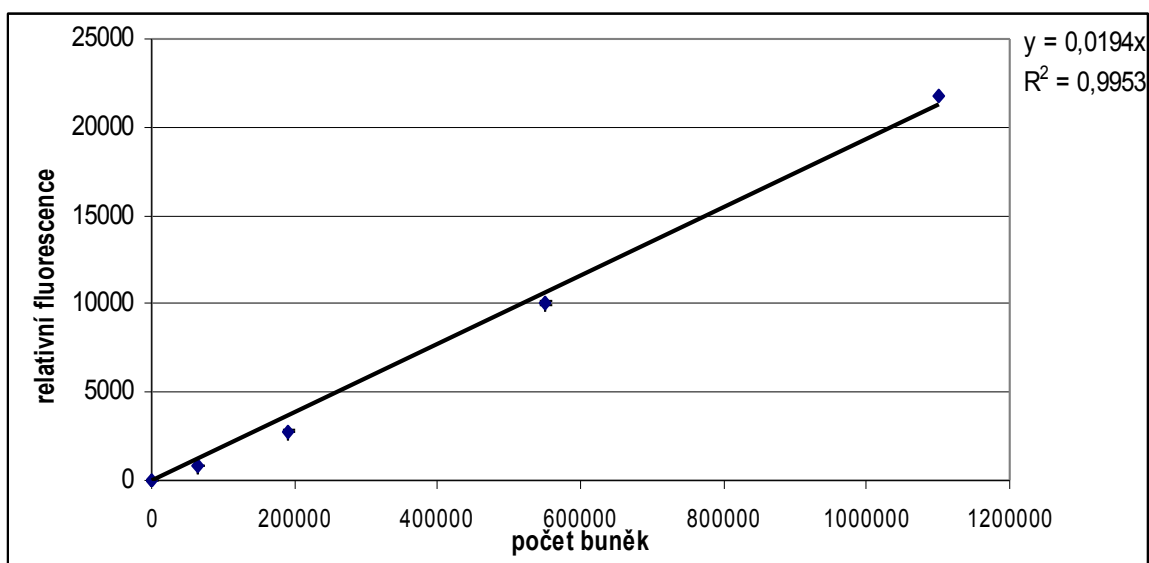


Obr. 4.6 Závislost fluorescence buněk NuLi-1 značených PKH 67 na jejich počtu. Tecan Infinite, nastavení pro PKH 67: 470 nm/505 nm, „gain“ 135, spodní čtení.

Tabulka 4.4 Závislost fluorescence linie CuFi-1 značené PKH 67 na jejich počtu. Data použita pro tvorbu kalibrační křivky.

počet buněk / jamka	Fluorescence (bez odečtu pozadí)	Relativní fluorescence (po odečtu pozadí)	Směrodatná odchylka
PBS	2897,3	0,0	0,0
$6,5 \cdot 10^4$	3749,0	851,8	21,2
$1,9 \cdot 10^5$	5682,3	2785,1	15,7
$5,5 \cdot 10^5$	12952,0	10054,8	88,0
$1,1 \cdot 10^6$	24700,3	21803,1	149,2

Data ze spektrofotometru pro tvorbu kalibrační křivky. Pozadí – PBS, Tecan Infinite nastavení pro PKH 67: 470 nm/505 nm, „gain“ 135, spodní čtení destičky.



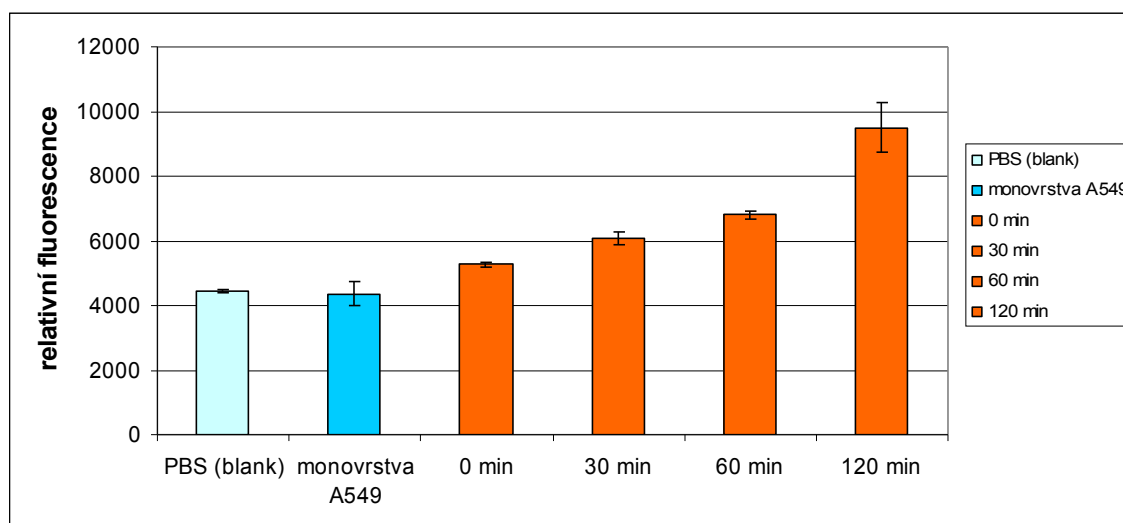
Obr. 4.7 Závislost fluorescence buněk CuFi-1 značených PKH 67 na jejich počtu. Tecan Infinite, nastavení pro PKH 67: 470 nm/505 nm, „gain“ 135, spodní čtení.

4.3 Optimalizace adhezních testů

Vzhledem k nejednoznačnosti literárních údajů, bylo třeba některé parametry adhezních testů optimalizovat a přizpůsobit pro náš modelový systém. Pro optimalizaci podmínek adhezních testů byla použita linie A549 a kmen *P. aeruginosa* PA K.

Po stanovení optimálního množství plicních buněk na jamku 24 – jamkové CellBind destičky byl uvažován vhodný poměr plicní buňky / bakterie. Zvolen byl 1:100 (tedy 100 bakterií na jednu plicní buňku).

Dále bylo třeba stanovit optimální čas inkubace linií plicních buněk s *P. aeruginosa*. Buňky linie A549 značené PKH 67 byly v množství $5 \cdot 10^5$ buněk nanесeny na jamky destičky CellBind (24 jamek) a ponechány adherovat do druhého dne (v 750 μ l media na jamku, 37 °C, 5% CO₂). Bakterie *P. aeruginosa* byly namnoženy přes noc v plném mediu a poté fluorescenčně označeny PKH 26. Následně byla připravena suspence *P. aeruginosa* o koncentraci $5 \cdot 10^7$ b/ml. Tato suspence byla nanесena v množství 300 μ l na jamky pokryté plicními buňkami, které byly předtím promyty PBS (což odpovídá poměru buňky : bakterie 1:100). Sledovány byly následující časy inkubace bakterií s buňkami: 0, 30, 60 a 120 minut. Vždy v daném čase byly příslušné jamky zbaveny bakteriální suspence a 3x promyty PBS. Odmyté jamky byly převrstveny 100 μ l PBS, aby nedošlo k poškození buněk. Poté byla destička změřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite. Jako slepý vzorek bylo použito PBS a jako kontrola jamka pokrytá monovrstvou buněk A549. Kratší časy nejsou dostačující, minimální čas je 60 minut, jako optimum byl stanoven čas 120 minut, který byl dále používán. Při delším čase společné inkubace buněk a bakterií začíná docházet k poškození buněk (mikroskopické pozorování). Optimalizace doby inkubace je shrnuta v grafu na obrázku 4.8.



Obr. 4.8 Fluorescence bakterií *P. aeruginosa* navázaných na buňkách A549 po různé době inkubace. Tecan Infinite, nastavení pro PKH 26: 522 nm/ 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení. Pozadí – PBS.

4.4 Interakce *Pseudomonas aeruginosa* s buňkami plicní tkáně

Po optimalizaci jednotlivých kroků adhezních testů byl studován vliv různých agens na interakci *P. aeruginosa* s buňkami plicní tkáně. Použity byly jednak sacharidy, ke kterým jsou specifické lektiny *P. aeruginosa* (PA-IL – galaktosa, PA-IIL – fukosa) a zejména pak slepičí protilátky proti lektinu PA-IIL (4K - kontrolní protilátka před imunizací, 4S – protilátka specifická proti PA-IIL). Použit byl bakteriální kmen PA K a linie A549, NuLi-1, CuFi-1.

4.4.1 Interakce *P. aeruginosa* s linií A549

Experiment byl proveden na 24 – jamkové destičce CellBind. Fluorescenčně (PKH 67) označené buňky A549 byly nanесeny na destičku v množství $5 \cdot 10^5$ b / jamka a ponechány adherovat do druhého dne, poté byly promyty od media pomocí PBS a podle schématu

provedení byly jednotlivé jamky převrstveny 300 μ l bakteriální suspence *P. aeruginosa* značené PKH 26 o koncentraci $5 \cdot 10^7$ b / ml obsahující studovaná agens (přesné složení suspensí bakterií s jednotlivými agens viz. kap. 3.6.1). Pro stanovení množství zachycených / adherovaných bakterií byla na stejnou destičku ze stejné základní suspence značených bakterií připravena kalibrační řada ($5 \cdot 10^7$ b / ml, $5 \cdot 10^6$ b / ml, $5 \cdot 10^5$ b / ml). Jako slepý vzorek („blank“) bylo použito PBS.

Poměr buněk A549 a bakterií PA byl 1:100, inkubace probíhala 2 h za laboratorní teploty. Po skončení inkubace byly jednotlivé jamky 3x důkladně promyty PBS a nakonec převrstveny 100 μ l PBS. Interakce byla vyhodnocena pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite a také mikroskopicky (Nikon Eclipse).

Ze získaných hodnot fluorescence buněk A549 a *P. aeruginosa* byla spočítána průměrná hodnota jednotlivých paralelních vzorků a standardní odchylka, od hodnot jednotlivých vzorků byla odečtena hodnota slepého vzorku (PBS). Hodnoty fluorescence byly použity pro stanovení vzájemného poměru buněk A549 a bakterií *P. aeruginosa*. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.5. Poměr fluorescence bakterií vzhledem k fluorescenci buněk u jednotlivých sledovaných agens je uveden na obrázku 4.9. Různý počet buněk A549 na jednotlivých jamkách je způsoben pravděpodobně uvolněním některých buněk během promývacích kroků.

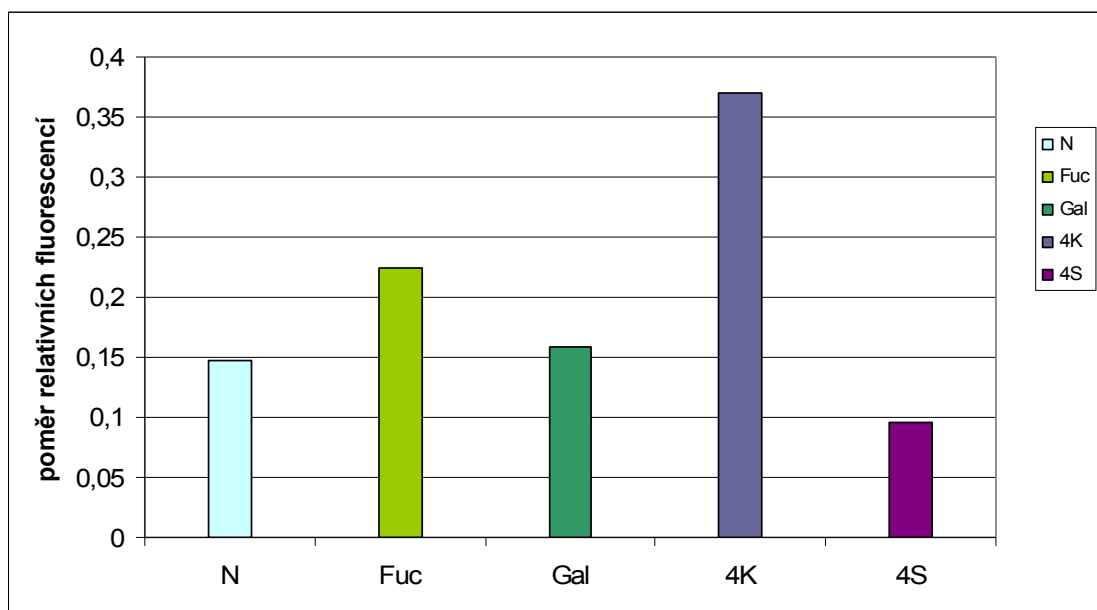
Ze získaných dat je možné shrnout, že po přidání slepičí protilátky specifické proti lektinu *P. aeruginosa* (PA-IIL) byl nejmenší počet bakterií na plicních buňkách A549, počet bakterií bez ovlivnění a s galaktosou byl podobný, naopak fukosa a kontrolní slepičí protilátka vykazují vyšší počet bakterií na buňkách. Lze tedy usuzovat, že specifická protilátka interakci ovlivňuje. Pokusy s využitím linie A549 byly prováděny pro účely optimalizace metodiky. Počet bakterií adherovaných na buňkách je důležitý zejména ve srovnání linií NuLi-1 (zdravý jedinec) a CuFi-1 (jedinec s CF), viz. dále.

Tabulka 4.5 Data získaná pomocí duální kvantifikace fluorescence s využitím Tecan Infinite.

	Rel. fluorescence A549	Standardní odchylka (A549)	Rel. fluorescence PA	Standardní odchylka (PA)	poměr r. fluorescence PA/A549
N	27667,7	1068,6	4084,5	151,1	0,14763
L-Fuc	28832,7	1169,1	6455,5	394,2	0,22389
D-Gal	29576,7	489,2	4673,8	366,5	0,15802
4K	28123,3	69,5	10393,2	204,0	0,36956
4S	25925,7	203,3	2466,2	190,7	0,095125

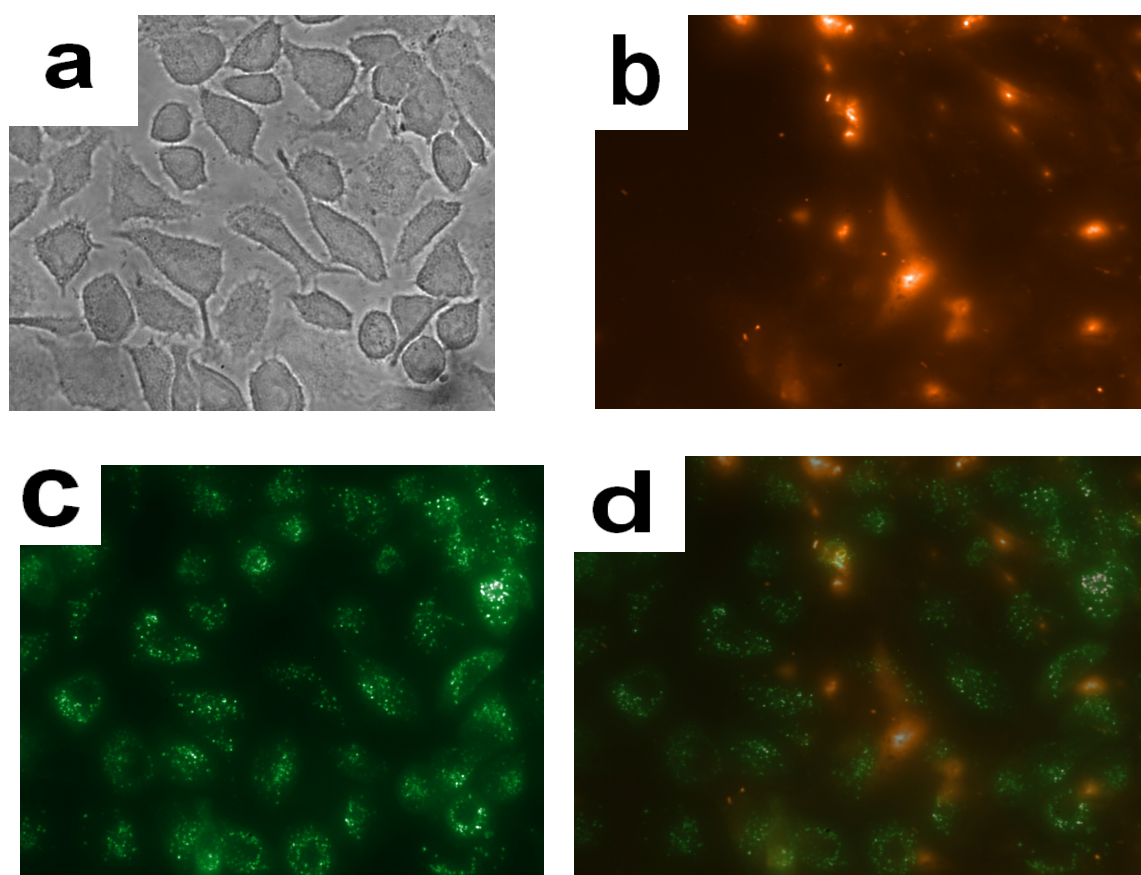
Hodnoty relativní fluorescence (po odečtu hodnoty slepého vzorku) pro PA a A549, standardní odchylky a vzájemný poměr obou fluorescencí. Tecan Infinite – nastavení pro PKH 67 (A549) : 470 nm/505 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4x4 plný kruh); nastavení pro PKH 26 (PA): 522 nm/569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4x4 plný kruh)

(N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)



Obr. 4.9 Poměr fluorescence bakterií *P. aeruginosa* ku fluorescenci linie A549 pro jednotlivá sledovaná agens. (N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

Kromě duální kvantifikace fluorescence obou složek modelového systému byla interakce bakterií s buňkami A549 hodnocena také mikroskopicky (Nikon Eclipse). Zde je v případě *P. aeruginosa* viditelná tvorba shluků a náznak slizové vrstvy. I v případě mikroskopického vyhodnocení jamek byl patrný nižší počet *P. aeruginosa* na buňkách v případě použití specifické protilátky. Příklad mikroskopického vyhodnocení je uveden na obrázku 4.10, který odpovídá PA s galaktosou, na snímku jsou patrné shluky bakterií. Pro práci s fluorescenčními snímky byl použit program Zoner Photo Studio 12 (import barvy, superpozice 2 snímků).



Obr. 4.10 Vyhodnocení adhezního testu na mikroskopu Nikon Eclipse. a – nativní snímek, b – *P. aeruginosa* značená PKH 26; c – linie A549 značená PKH 67; d - superpozice snímků fluorescence PKH 67 (A549) a PKH 26 (*P. aeruginosa*)

4.4.2 Interakce *P. aeruginosa* s liniemi NuLi-1 a CuFi-1

Experiment byl proveden na 24 – jamkové destičce CellBind. Buňky linie NuLi-1 (zdravý jedinec)/CuFi-1 (CF pacient) fluorescenčně označené PKH 67 byly nanесeny v množství $5 \cdot 10^5$ b / jamka a ponechány adherovat více než 24h. Následně byly promyty PBS od zbytků media a převrstveny 300 μ l příslušné bakteriální suspence (PA značená PKH 26) o koncentraci $5 \cdot 10^7$ b / ml se sledovanými agens, dle schématu experimentu. Pro orientační stanovení množství navázaných bakterií byla na stejnou destičku ze stejné základní bakteriální suspence připravena kalibrační řada ($5 \cdot 10^7$ b / ml; $5 \cdot 10^6$ b / ml; $5 \cdot 10^5$ b / ml). Sledována byla jednak PA kultivovaná v klasickém Ps mediu a také PA pěstovaná v minimálním mediu M9.

V experimentu byl použit poměr buněk NuLi-1/CuFi-1 a PA 1:100, společná inkubace probíhala 2 h za laboratorní teploty. Po ukončení inkubace byly jamky 3x důkladně promyty PBS a nakonec převrstveny 100 μ l PBS (aby se zabránilo vyschnutí / poškození buněk), za navázané bakterie je brána hodnota fluorescence po odmytí popsaném výše. Fluorescence obou typů buněk byla kvantifikována pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite a experiment byl zhodnocen také mikroskopicky na Nikon Eclipse.

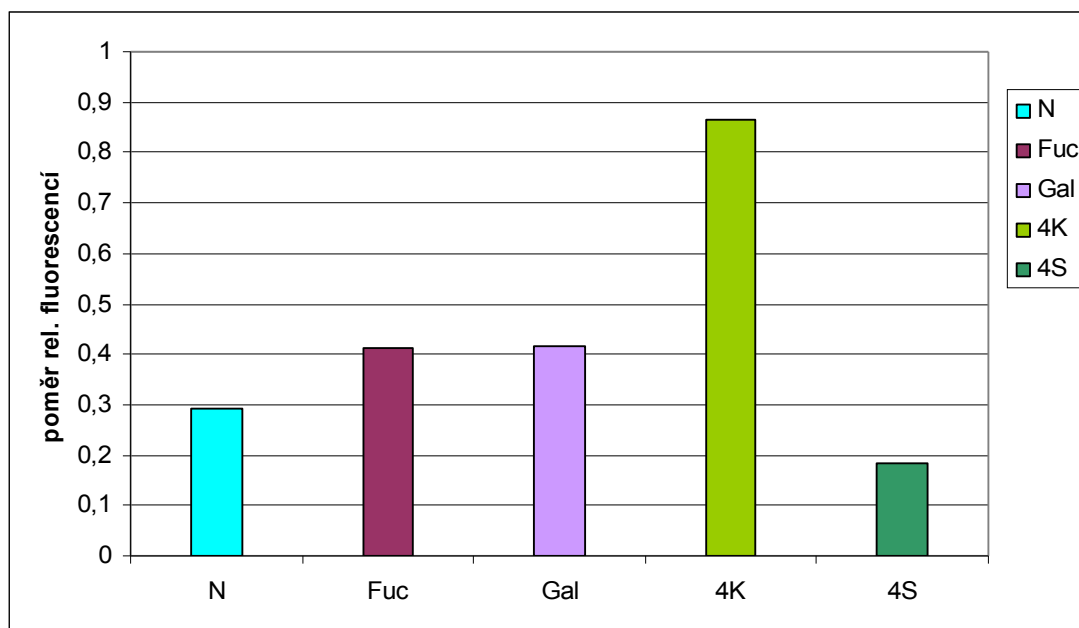
Ze získaných hodnot fluorescence byla počítána hodnota relativní fluorescence (po odečtení hodnoty slepého vzorku) pro jednotlivá sledovaná agens, výsledná hodnota je průměr z odpovídajících paralelních vzorků, stanovena byla standardní odchylka. Pro zhodnocení vlivu jednotlivých agens byl použit poměr fluorescence PA ku fluorescenci linie NuLi-1/CuFi-1. Získaná data pro linii NuLi-1 jsou shrnuta v tabulce 4.6 a grafické znázornění poměru relativních fluorescencí u jednotlivých agens v obrázku 4.11.

Tabulka 4.6 Data získaná pomocí duální kvantifikace fluorescence na spektrofotometru Tecan Infinite pro linii NuLi-1 a PA kultivovanou v klasickém Ps mediu.

	Rel. fluorescence PA	Standardní odchylka (PA)	Rel. fluorescence NuLi	Standardní odchylka (NuLi-1)	poměr fluorescence PA/NuLi
N	2415,5	145,8	8252,0	132,3	0,29272
Fuc	3572,8	199,8	8693,0	290,8	0,41099
Gal	3253,5	286,1	7812,3	314,2	0,41646
4K	6817,0	429,1	7877,3	451,1	0,86539
4S	1469,2	90,5	7981,0	125,9	0,18408

Hodnoty relativní fluorescence (po odečtu hodnoty slepého vzorku) pro PA a NuLi-1, standardní odchylky a vzájemný poměr obou fluorescencí. Fluorescence linie NuLi-1 značené PKH 67 byla stanovena při nastavení: 470 nm / 505 nm, „gain“ 135, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Fluorescence PA značené PKH 26 byla stanovena při: 522 nm / 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Jako slepý vzorek (pozadí) bylo používáno PBS.

(N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)



Obr. 4.11 Grafické znázornění poměru fluorescence bakterií *P. aeruginosa* vzhledem k fluorescenci linie NuLi-1 pro jednotlivá sledovaná agens. (N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

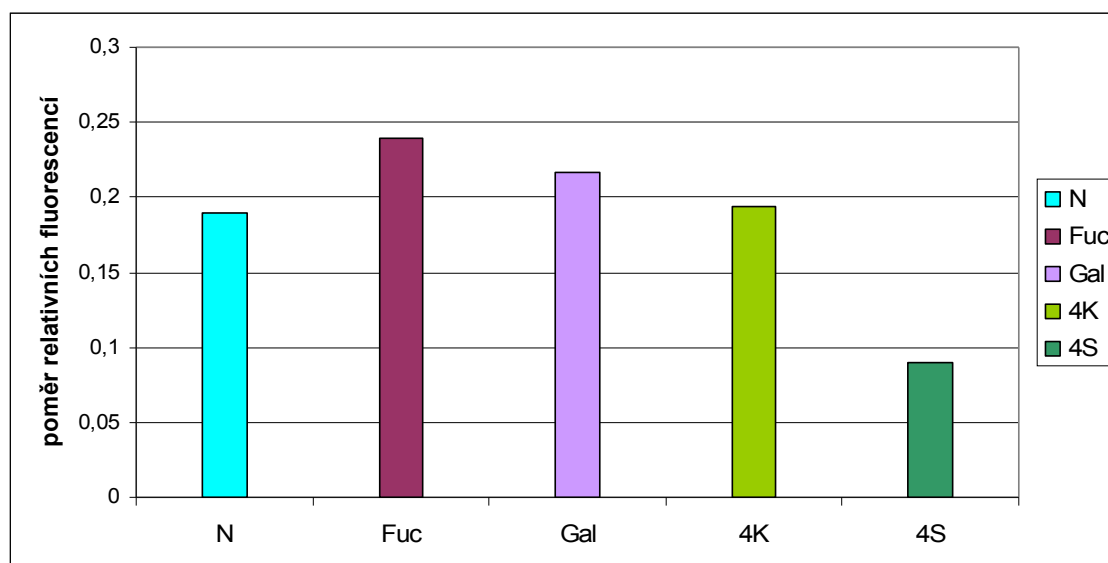
Data získaná pro PA kultivovanou v M9 jsou shrnuta v tabulce 4.7 a na obrázku 4.12.

Tabulka 4.7 Data získaná pomocí duální kvantifikace fluorescence s využitím Tecan Inifinite pro linii NuLi-1 a PA kultivovanou v minimálním mediu.

	Rel. fluorescence PA-M9	Standardní odchylka (PA)	Rel. fluorescence NuLi	Standardní odchylka (NuLi-1)	poměr fluorescence PA/NuLi
N	991,0	46,7	5218,5	22,2	0,1899
Fuc	1181,7	81,1	4937,8	344,4	0,23931
Gal	1077,0	50,7	4972,2	109,7	0,21661
4K	894,7	50,2	4612,5	285,2	0,19397
4S	421,0	23,4	4667,5	141,6	0,090198

Hodnoty relativní fluorescence (po odečtu hodnoty slepého vzorku) pro PA a NuLi-1, standardní odchylky a vzájemný poměr obou fluorescencí. Fluorescence linie NuLi-1 značené PKH 67 byla stanovena při nastavení: 470 nm / 505 nm, „gain“ 135, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Fluorescence PA značené PKH 26 byla stanovena při: 522 nm / 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Jako slepý vzorek (pozadí) bylo používáno PBS.

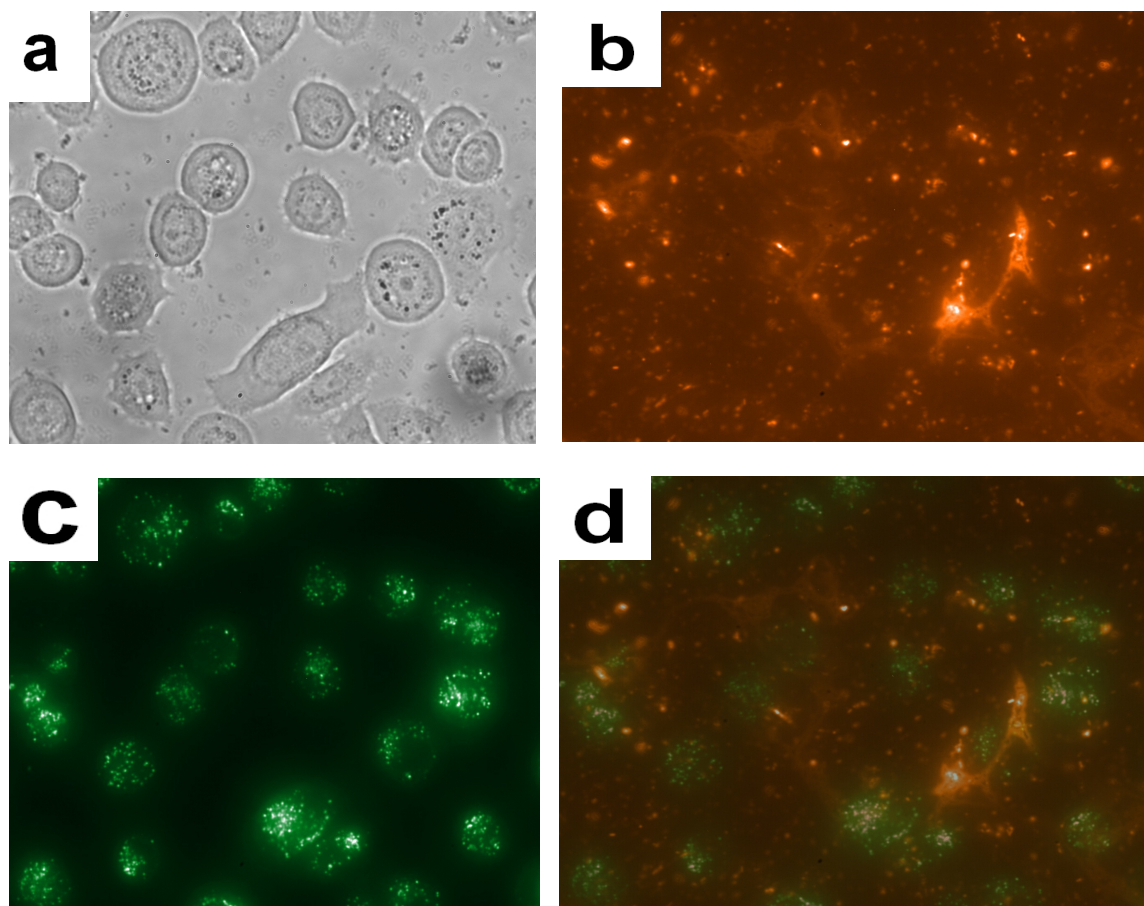
(N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-III; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)



Obr. 4.12 Grafické znázornění poměru fluorescence bakterií *P. aeruginosa* kultivovaných v minimálním mediu M9 vzhledem k fluorescenci linie NuLi-1 pro jednotlivá sledovaná agens. (N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-III; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

V případě PA kultivované v minimálním mediu M9 je trend obdobný jako v případě PA kultivované v normálním Ps mediu. Samotné sacharidy ani kontrolní slepičí protilátka nemají výrazný vliv na interakci bakterie *P. aeruginosa* s linií NuLi-1, naopak vliv protilátky 4S specifické vůči bakteriálnímu lektinu PA-IIL je zcela jednoznačně patrný.

Mikroskopické zhodnocení jednotlivých vzorků koreluje s daty získanými na spektrofotometru Tecan Infinite. Množství značených PA je jednoznačně nejmenší v případě specifické protilátky 4S, v případě ostatních sledovaných agens je po vizuálním zhodnocení množství PA velmi podobné. U neovlivněných a bakterií inkubovaných se sacharidy je pozorovatelná tendence shlukovat se a tvořit slizovou vrstvu. Příklad zhodnocení experimentu na mikroskopu Nikon Eclipse je uveden v obrázku 4.13, který odpovídá *P. aeruginosa* s L-fukosou.



Obr. 4.13 Vyhodnocení interakce linie NuLi-1 a PA na mikroskopu Nikon Eclipse, zde zachyceno provedení s L-fukosou. a – nativní snímek, b – *P. aeruginosa* značená PKH 26; c – linie NuLi značená PKH 67; d - superpozice snímků fluorescence PKH 67 (NuLi-1) a PKH 26 (*P. aeruginosa*)

Experiment probíhal stejně i pro linii CuFi-1 (CF pacient, homozygot pro F508del). Pro zhodnocení vlivu jednotlivých agens byl použit poměr fluorescence PA ku fluorescenci linie CuFi-1. Data jsou shrnuta v tabulce 4.8 a vliv sledovaných agens vyjádřený poměrem obou fluorescencí je graficky zachycen na obrázku 4.14.

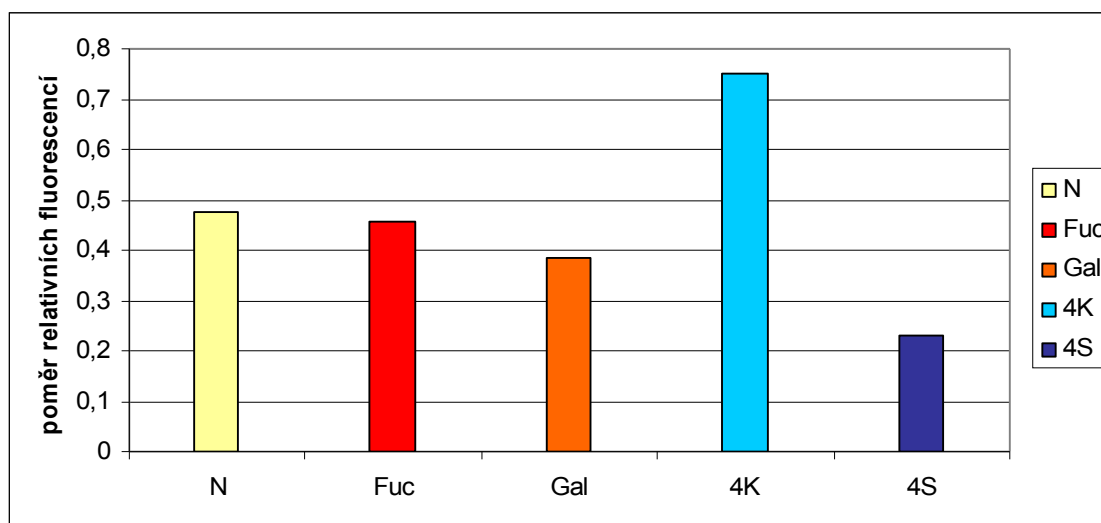
Z uvedených dat je patrné, že množství bakterií na buňkách je vyšší než v případě linie NuLi-1 (zdravá kontrola). Sacharidy nevýznamně snižují množství bakterií oproti vzorku bez ovlivnění a jednoznačně je patrný vliv specifické protilátky 4S, kde je výrazně nižší počet bakterií na buňkách.

Tabulka 4.8 Data získaná pomocí duální kvantifikace fluorescence PA a linie CuFi-1 s využitím spektrofotometru.

	Rel. fluorescence PA	Standardní odchylka (PA)	Rel. fluorescence CuFi-1	Standardní odchylka (CuFi-1)	poměr fluorescence PA/CuFi
N	4024,2	547,8	8468,8	143,5	0,47517
Fuc	4112,5	365,6	9028,2	224,3	0,45552
Gal	3259,5	185,5	8503,8	460,4	0,38329
4K	5781,8	136,2	7703,8	1230,0	0,75051
4S	1904,5	92,8	8304,5	139,3	0,22933

Hodnoty relativní fluorescence (po odečtu hodnoty slepého vzorku) pro PA a CuFi-1, standardní odchylky a vzájemný poměr obou fluorescencí. Fluorescence linie CuFi-1 značené PKH 67 byla stanovena při nastavení: 470 nm / 505 nm, „gain“ 135, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Fluorescence PA značené PKH 26 byla stanovena při: 522 nm / 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Jako slepý vzorek (pozadí) bylo používáno PBS.

(N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)



Obr. 4.14 Grafické znázornění poměru fluorescence bakterií *P. aeruginosa* vzhledem k fluorescenci linie CuFi-1 pro jednotlivá sledovaná agens. (N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-III; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

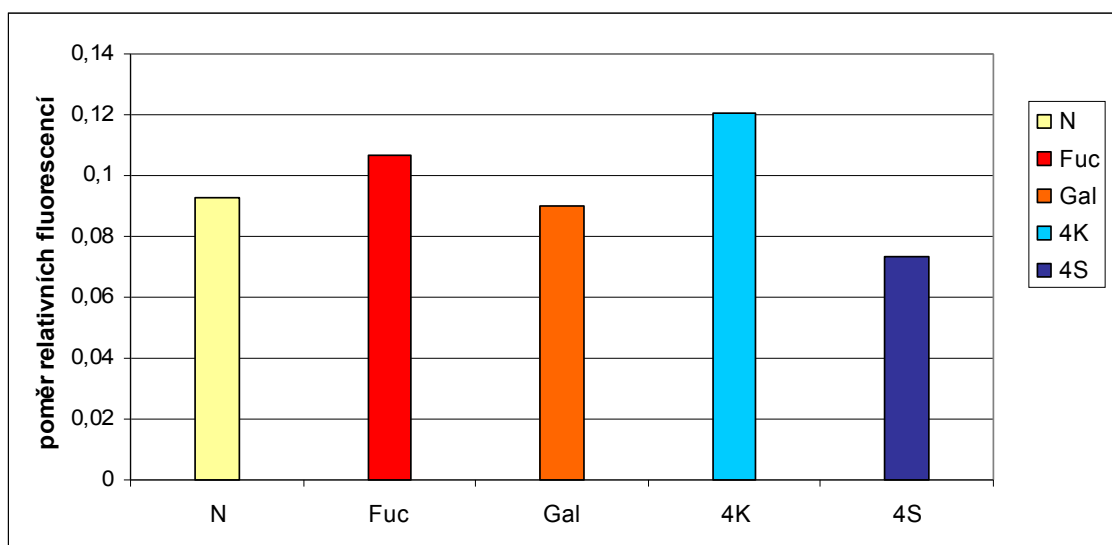
Data získaná pro *P. aeruginosa* kultivovanou v minimálním mediu M9 jsou shrnuta v tabulce 4.9 a grafické znázornění poměru obou fluorescencí v obrázku 4.15. Vliv jednotlivých agens je v tomto případě méně patrný, trend je podobný spíše datům získaných z linie NuLi-1, sacharidy nemají výrazný vliv na interakci, kontrolní protilátka množství bakterií na buňkách spíše zvyšuje, naopak specifická protilátka toto množství snižuje.

Tabulka 4.9 Data získaná pomocí duální kvantifikace fluorescence pro PA kultivovanou v minimálním mediu M9 a linii CuFi-1 s využitím Tecan Inifinite.

	Rel. fluorescence PA-M9	Standardní odchylka (PA)	Rel. fluorescence CuFi	Standardní odchylka (CuFi)	poměr fluorescence PA/CuFi
N	531,0	12,8	5727,0	120,6	0,092719
Fuc	651,7	23,3	6106,3	118,5	0,10672
Gal	536,0	32,0	5960,3	126,6	0,089928
4K	595,7	36,5	4934,3	163,4	0,12072
4S	339,7	36,1	4625,0	313,9	0,073442

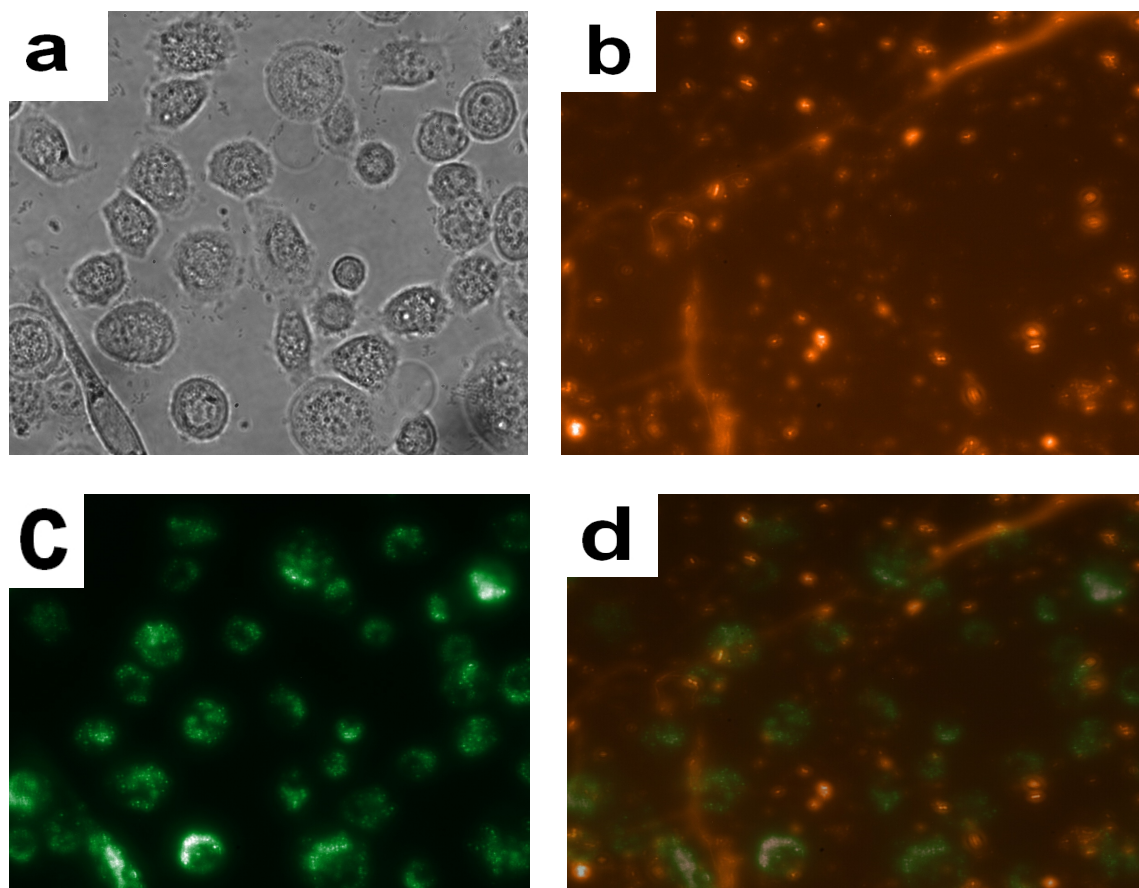
Hodnoty relativní fluorescence (po odečtu hodnoty slepého vzorku) pro PA a CuFi-1, standardní odchylky a vzájemný poměr obou fluorescencí. Fluorescence linie CuFi-1 značené PKH 67 byla stanovena při nastavení: 470 nm / 505 nm, „gain“ 135, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Fluorescence PA značené PKH 26 byla stanovena při: 522 nm / 569 nm, „gain“ 160, spodní čtení, mnohonásobné čtení jamek (4 x 4 plný kruh). Jako slepý vzorek (pozadí) bylo používáno PBS.

(N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

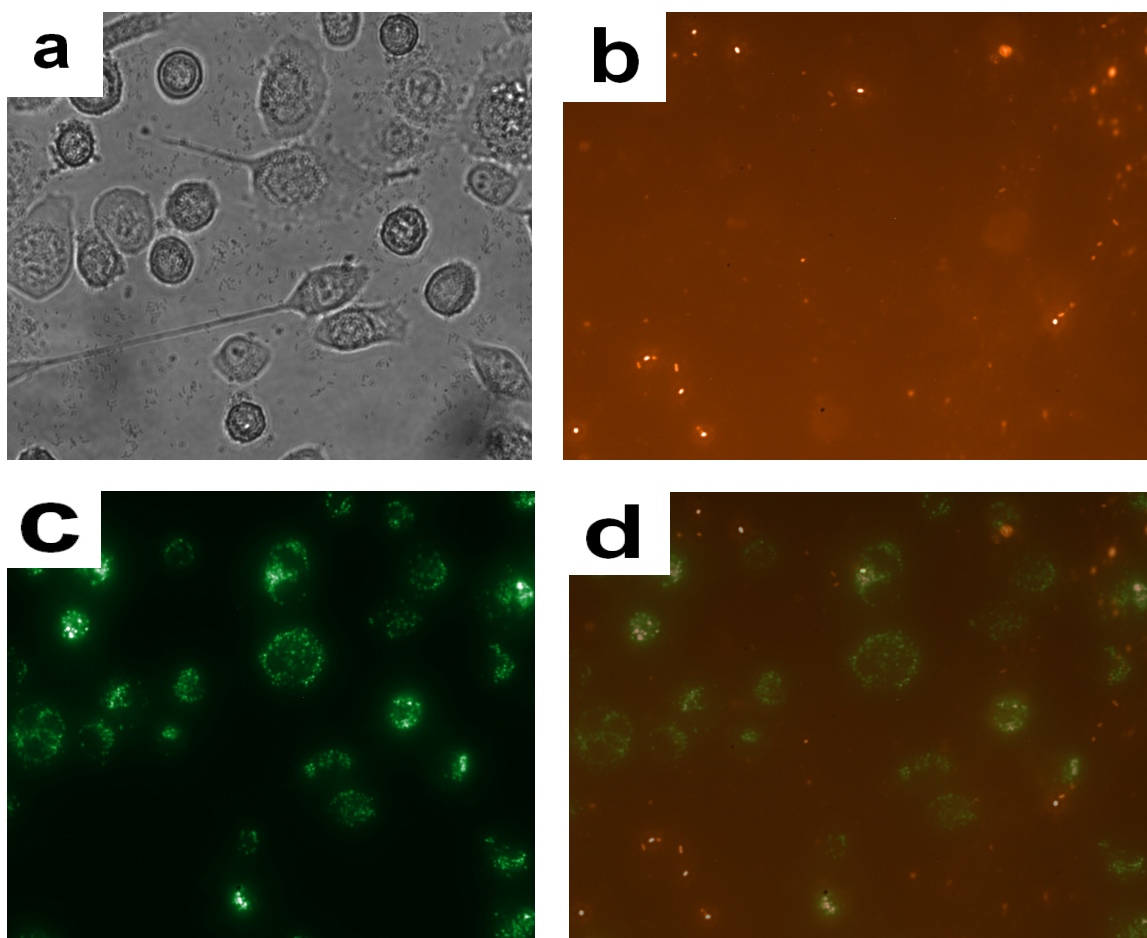


Obr. 4.15 Grafické znázornění poměru fluorescence bakterií *P. aeruginosa* kultivovaných v M9 vzhledem k fluorescenci linie CuFi-1 pro jednotlivá sledovaná agens. (N – neovlivněné PA; L-Fuc – fukosa; D-Gal – galaktosa; 4K – kontrolní slepičí protilátka; 4S – slepičí protilátka specifická proti lektinu PA-IIL; PA – *Pseudomonas aeruginosa*)

Interakce *P. aeruginosa* s buňkami linie CuFi-1 byla sledována také na mikroskopu Nikon Eclipse. Pozorování korelují s daty získanými duální kvantifikací fluorescence na Tecan Infinite. V případě sacharidů je patrná tvorba bakteriálních shluků a v případě fukosy i slizové vrstvy, který je v případě galaktosy zastoupen méně nebo vůbec (PA-M9). Shluky jsou patrné i v případě kontrolní protilátky. U neovlivněných vzorků byly pozorovány oba efekty – shluky bakterií i náznak slizové vrstvy. V případě specifické protilátky je zcela jasně patrné menší množství bakterií oproti ostatním vzorkům, bakterie vykazují i vyšší mobilitu, pozorována byla v malé míře tvorba shluků. Příklad mikroskopického zhodnocení je uveden na obrázcích 4.16 a 4.17.



Obr. 4.16 Vyhodnocení interakce linie CuFi-1 a PA na mikroskopu Nikon Eclipse, zde zachyceno provedení s D-galaktosou. a – nativní snímek, b – *P. aeruginosa* značená PKH 26; c – linie CuFi-1 značená PKH 67; d - superpozice snímků fluorescence PKH 67 (CuFi-1) a PKH 26 (*P. aeruginosa*).



Obr. 4.17 Vyhodnocení interakce linie CuFi-1 a PA na mikroskopu Nikon Eclipse, zde zachyceno provedení s protilátkou specifickou vůči bakteriálnímu lektinu. a – nativní snímek, b – *P. aeruginosa* značená PKH 26; c – linie CuFi-1 značená PKH 67; d - superpozice snímků fluorescence PKH 67 (CuFi-1) a PKH 26 (*P. aeruginosa*).

4.4.3 Srovnání linií NuLi-1 a CuFi-1

Celá práce se zabývá studiem interakce *P. aeruginosa* s buňkami plicní tkáně v souvislosti s cystickou fibrosou. Klíčové je srovnání interakce této bakterie s linií NuLi-1, což jsou buňky zdravého jedince a linií CuFi-1, což jsou buňky pacienta s CF (homozygot, nejčtenější mutace F508del). Ze sledovaných agens nás nejvíce zajímají slepičí protilátky, které jsou uvažovány jako prostředek pasivní imunizace nemocných CF.

Ze získaných hodnot uvedených v kap. 4.4.2 je patrné, že v případě CuFi-1 linie je počet navázaných bakterií do jisté míry vyšší než u NuLi-1 a to pro všechny sledované agens i v případě neovlivněných bakterií.

Vybrané sacharidy byly použity vzhledem k jejich specifitě vůči lektinům *P. aeruginosa* (galaktosa – PA-IL, fukosa – PA-IIL), ale na interakci mají nevýrazný vliv. U linie NuLi-1 sacharidy způsobují mírně zvýšené množství bakterií na buňkách oproti neovlivněné kontrole, v případě linie CuFi-1 je množství bakterií v přítomnosti sacharidů nepatrně nižší – v případě fukosy byl pokles 4%, u galaktosy 19 %. Pokud byla *P. aeruginosa* kultivována v minimálním mediu, rozdíly mezi liniemi nejsou pozorovány a trend množství bakterií na buňkách je podobný u linie NuLi-1 i CuFi-1.

V experimentu byly používány slepičí protilátky – jednak kontrolní protilátka (4K) kdy zvíře nebylo imunizováno a také protilátka specifická vůči bakteriálnímu lektinu PA-IIL (4S) izolovaná ze zvířete imunizovaného daným antigenem. Kontrolní protilátka množství adherovaných bakterií na buňkách obou linií zvyšuje. Použití specifické protilátky prokazatelně snížilo množství adherovaných bakterií na buňkách obou linií, lze tedy předpokládat, že specifická protilátka je schopna zabránit interakci *P. aeruginosa* s buňkami plicní tkáně. Množství bakterií na buňkách plicních tkáně po ošetření specifickou protilátkou kleslo přibližně o 30 %, v případě linie CuFi-1 pak o více než 50% oproti neošetřené kontrole. Hodnocení provedená na mikroskopu korelují s daty získanými ze spektrofluorimetru. Použití specifické protilátky ukázalo ve srovnání s ostatními vzorky jednoznačně menší množství bakterií.

4.5 Průtoková cytometrie

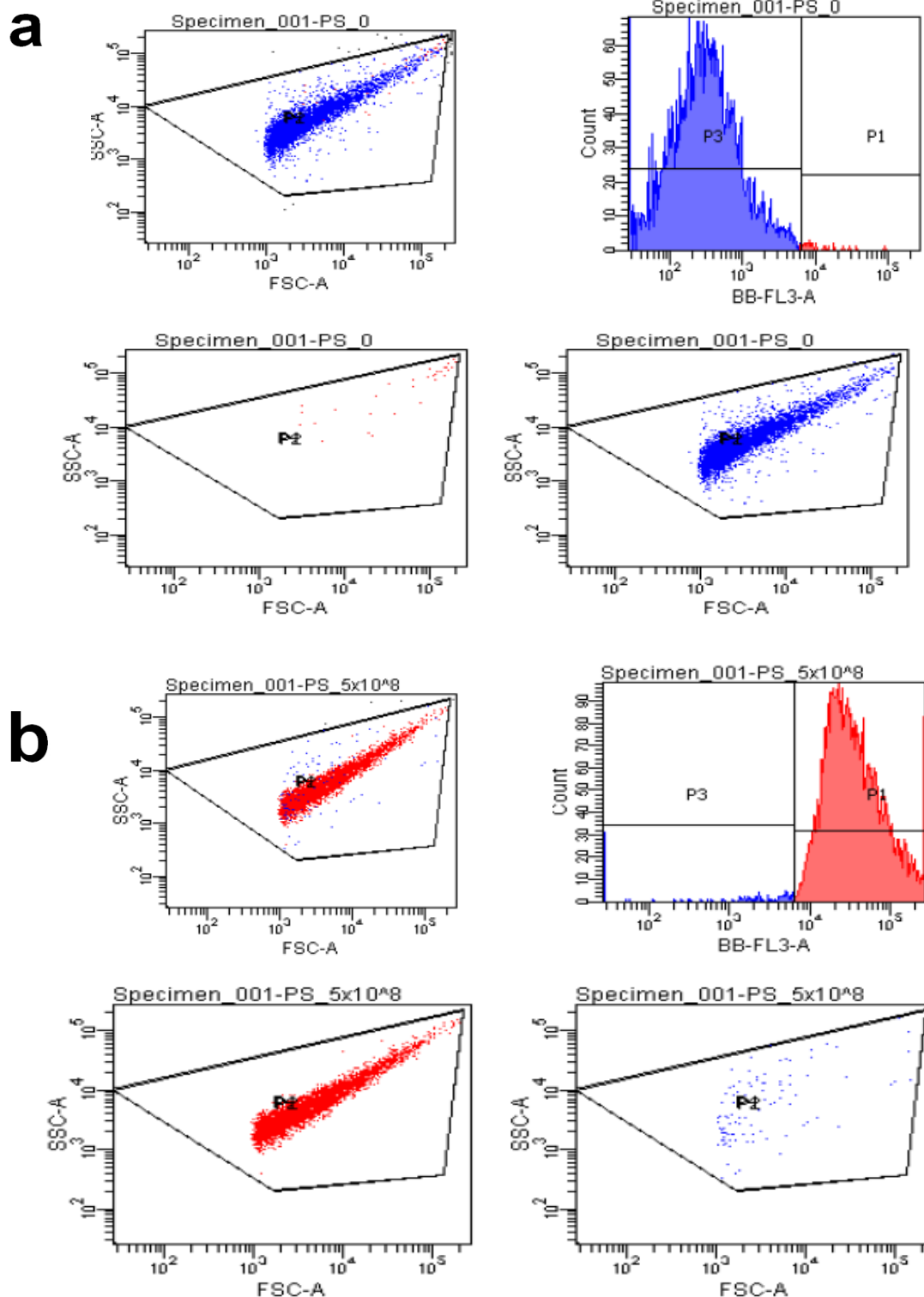
Interakce *P. aeruginosa* s buňkami plicní tkáně byla hodnocena i za použití průtokové cytometrie. V případě našeho modelového systému tato metoda vyžadovala optimalizaci a není pro náš modelový systém zcela vhodná, protože námi používané linie jsou adherentní. Pro měření je nutné převést buňky do suspensione, což buňky mění a ještě méně odpovídá skutečnému stavu buněk v plicích. Vliv vybraných agens na adhezi *P. aeruginosa* nebyl v tomto případě studován vzhledem k omezením našeho modelového systému.

Měření byla provedena na průtokovém cytometru Canto II s programem Diva software (v. 6.1.2) na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty UK ve spolupráci s MUDr. Zorou Mělkovou Ph.D.

4.5.1 Stanovení *Pseudomonas aeruginosa*

Zajímala nás adheze *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu, které jsou na průtokovém cytometru dobře stanovitelné. V případě detekce bakterií bylo třeba změnit nastavení a vybrat sledované populace buněk a bakterií.

U průtokového cytometru není možné nastavit konkrétní vlnovou délku excitace. V případě *P. aeruginosa* značené PKH 26 tak nedochází ke zcela optimální excitaci a hodnoty emise jsou menší. Hodnoty získané z jednotlivých měření vykazují velký rozptyl v závislosti na úspěšnosti značení. Příklad vyhodnocení fluorescence *P. aeruginosa* je uveden na obrázku 4.18 a v tabulce 4.10. Byla vybrána populace bakterií (P2) a v této populaci znázorněna distribuce částic s nízkou a vysokou fluorescencí (P3, resp. P1).



Obr. 4.18 Charakterizace fluorescence *P. aeruginosa* pomocí průtokového cytometru. Srovnání kontrolní neznačené PA (a) a PA značené PKH 26 (b). Zobrazena je dvourozměrná analýza FSC-A x SSC-A a populace bakterií P2, jejíž fluorescence v kanále FL3 byla hodnocena. Populace P3 (modrá) – nízká fluorescence, populace P1 (červená) – vysoká fluorescence.

Tabulka 4.10 Charakterizace *P. aeruginosa* pomocí průtokového cytometru. Srovnání kontrolní neznačené PA a PA značené PKH 26.

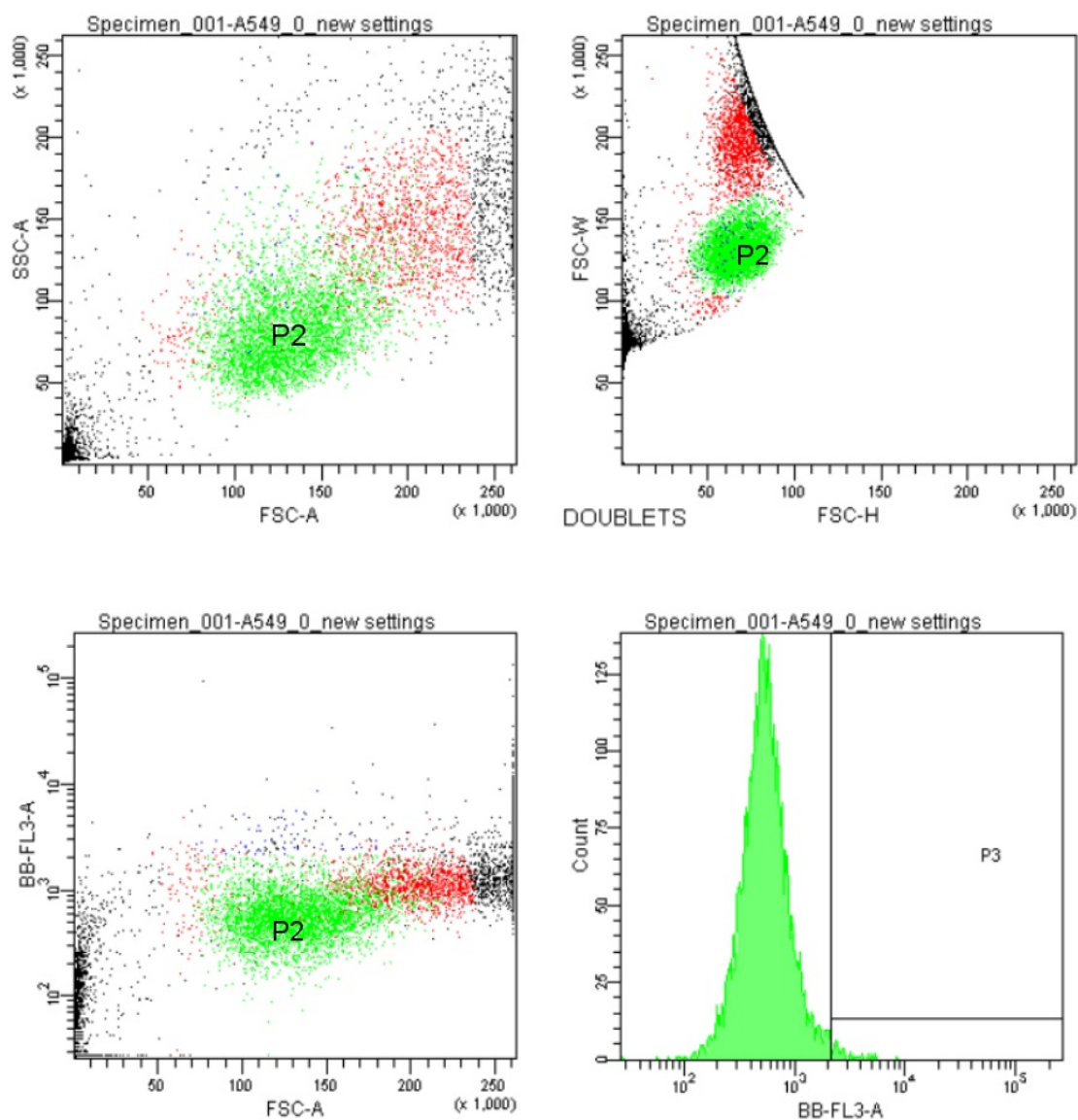
	PA kontrolní	PA značená PKH 26
počet měřených událostí ("events")	5060 (100%)	5000 (100%)
počet PA s nízkou fluorescencí (P3)	4923 (97%)	99 (2%)
počet PA s vysokou fluorescencí (P1)	33 (1%)	4887 (98%)

Srhnuta jsou data z obrázku 4.18. Populace P2 vyznačuje stanovovaný soubor, jehož fluorescence byla hodnocena. Populace P1 (modrá) – nízká fluorescence, populace P3 (červená) – vysoká fluorescence.

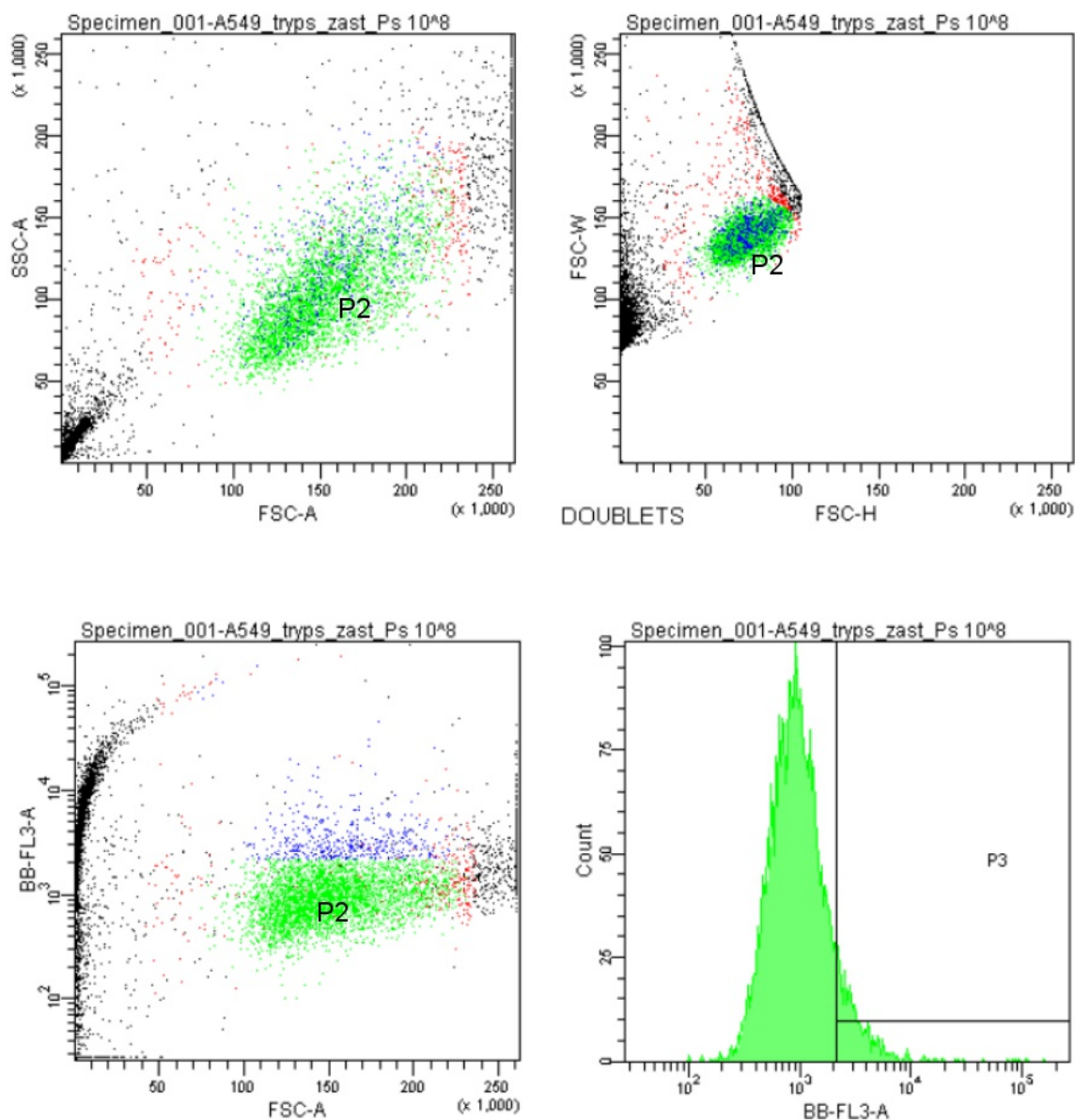
4.5.2 Optimalizace měření adhezního testu s využitím linie A549

Vzhledem k tomu, že měření na průtokovém cytometru probíhá na buněčné suspensi, byla pro studium interakce *P. aeruginosa* s námi využívanými adherentními liniemi studována možnost převedení buněk po inkubaci s bakteriemi do suspence.

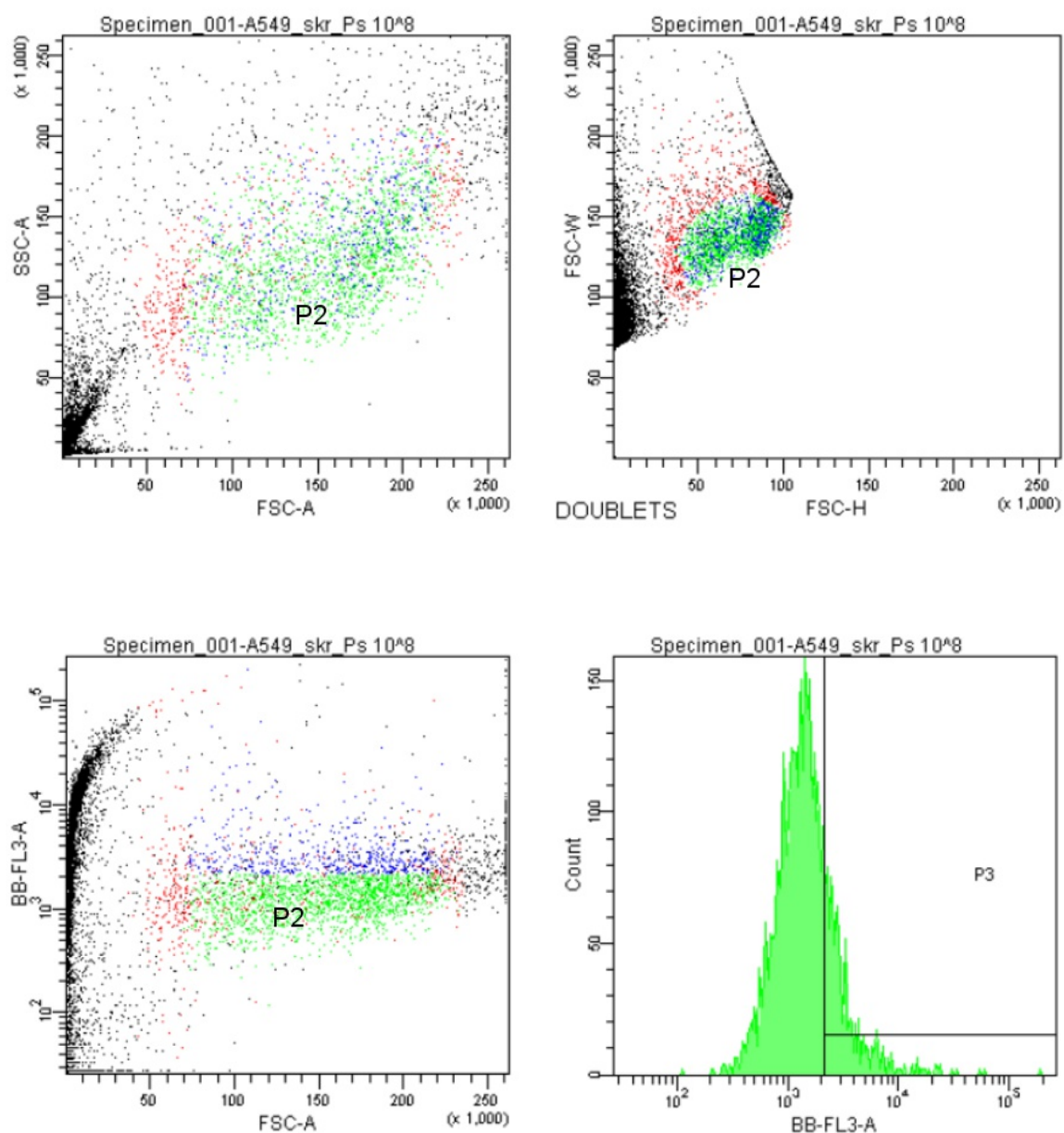
Buňky linie A549 byly po dostatečné adhezenci na 6-jamkovou destičku CellBind promyty PBS a převrstveny bakteriální suspensí PA značené PKH 26 o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml (poměr buněk a bakterií byl oproti experimentu na Tecan Infinite vyšší – 1:200). Inkubace probíhala 2 h za laboratorní teploty, po skončení inkubace byly jednotlivé jamky 3x důkladně promyty PBS. Pro uvedení buněk do suspence byla jedna část jamek trypsinizována jako při standardní subkultivaci (reakce zastavena 1% FBS) a 2. část mechanicky uvolněna („seškrábána“) za pomoci speciální škrabky pro tkáňové kultury. Takto získané suspence byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie v lineárním nastavení FSC a SSC. Jako kontrola byly použity samotné buňky A549. Data jsou shrnuta v tabulce 4.11 a na obrázcích 4.19, 4.20 a 4.21. Z výsledku plyne, že trypsinizace vede ke snížení detegované fluorescence, trypsinizace tedy byla použita pro srovnání, protože pro adhezní testy není vhodná.



Obr. 4.19 Charakterizace samotných buněk A549 bez značené *P. aeruginosa* pomocí průtokové cytometrie. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A a dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk (těm odpovídá červená barva). Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence (P3 – modrá).



Obr. 4.20 Charakterizace buněk A549 inkubovaných se značenou *P. aeruginosa* a poté trypsinizovaných pomocí průtokové cytometrie. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A a dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk (těm odpovídá červená barva). Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A (PKH 26) a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence (P3 – modrá).



Obr. 4.21 Charakterizace buněk A549 inkubovaných se značenou *P. aeruginosa*, které byly do suspence převedeny mechanicky (škrábáním), pomocí průtokové cytometrie. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A a dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk (těm odpovídá červená barva). Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A (PKH 26) a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence (P3 – modrá).

Tabulka 4.11 Vyhodnocení dat z cytometru pro optimalizaci adhezního experimentu.

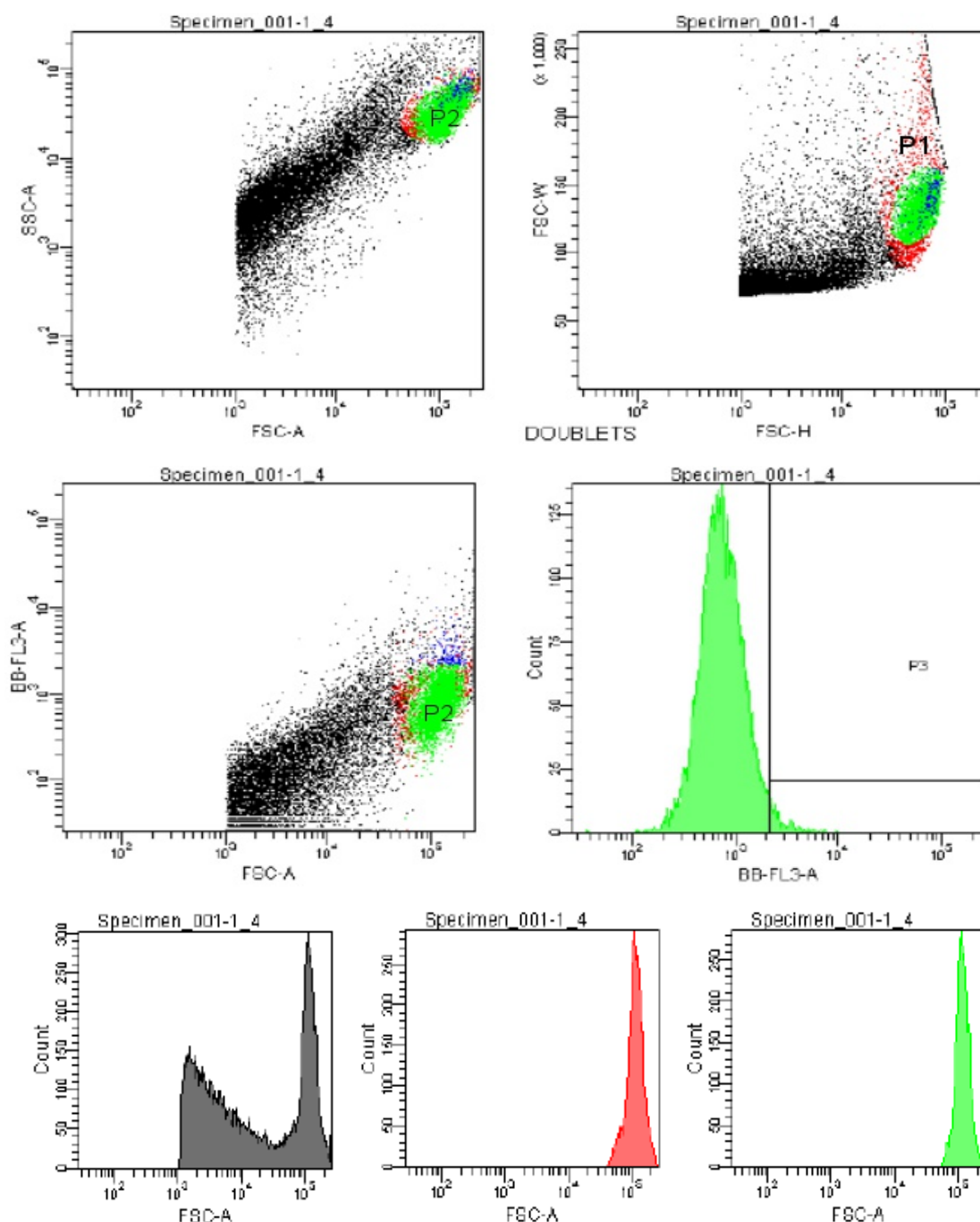
	A549 kontrolní	A549-PA trypsinizované	A549-PA škrábané
Celkový počet detegovaných částic	10 000	10 000	10 000
počet analyzovaných buněk A549 (P2)	4208 (100%)	4323 (100%)	2256 (100%)
počet buněk A549 s vysokou fluorescencí (P3)	53 (1%)	450 (10,4%)	511 (22,7%)

Srovnání buněk A549 samotných, buněk A549 s PA trypsinizovaných a buněk A549 s PA škrábaných. PA značená PKH 26. Odpovídá obrázkům 4.19 – 4.21. Vybraná populace P2 obsahuje pouze jednotlivé buňky bez dubletů nebo shluků buněk.

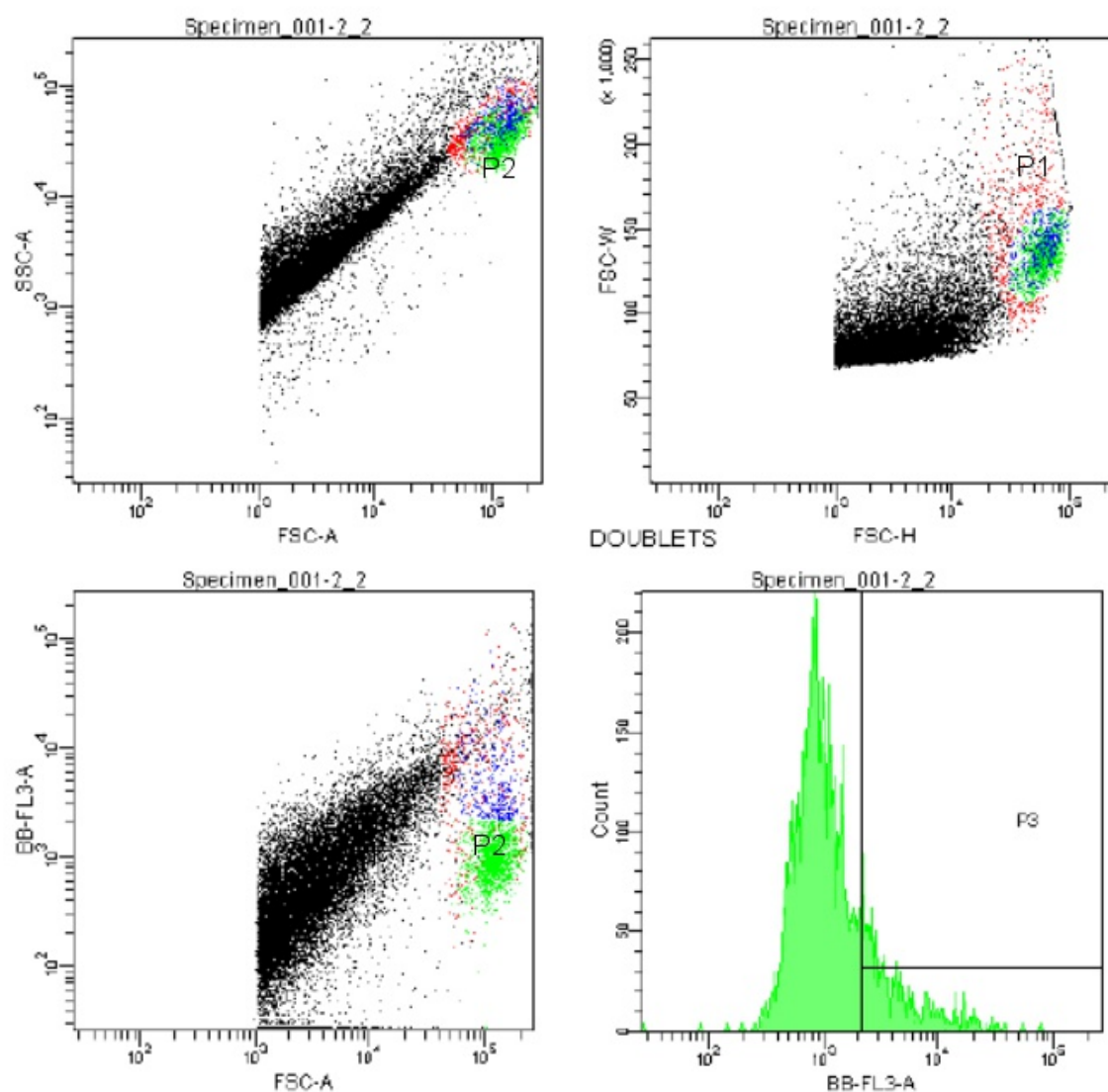
4.5.3 Interakce buněk plicní tkáně s *P. aeruginosa*

Provedení adhezních testů s vyhodnocením na průtokovém cytometru bylo analogické jako pro vyhodnocení pomocí spektrofleurimetru Tecan Infinite. Používána byla 24-jamková destička CellBind, na kterou bylo nanášeno $5 \cdot 10^5$ buněk/jamka. Buňky byly na destičce ponechány adherovat do druhého dne. Následně byly jamky promyty PBS od zbytků media a vybrané jamky byly převrstveny 300 μ l bakteriální suspence PA o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml bez předchozího fluorescenčního značení bakterie a s fluorescenčně značenými bakteriemi. Poměr buněk a bakterií byl tedy 1:200. Po 2 h inkubaci a následném promytí PBS byly buňky s navázanými bakteriemi v malém množství PBS mechanicky převedeny (seškrábány) do suspence. Takto získané suspence buněk s adherovanými bakteriemi byly analyzovány na průtokovém cytometru v logaritmickém nastavení FSC a SSC. Jako negativní kontrola byly použity samotné seškrábané buňky (stejný postup jako výše, pouze bez inkubace s PA) a buňky inkubované s neznačenou PA. Každý experiment byl proveden ve 4 paralelních vzorcích.

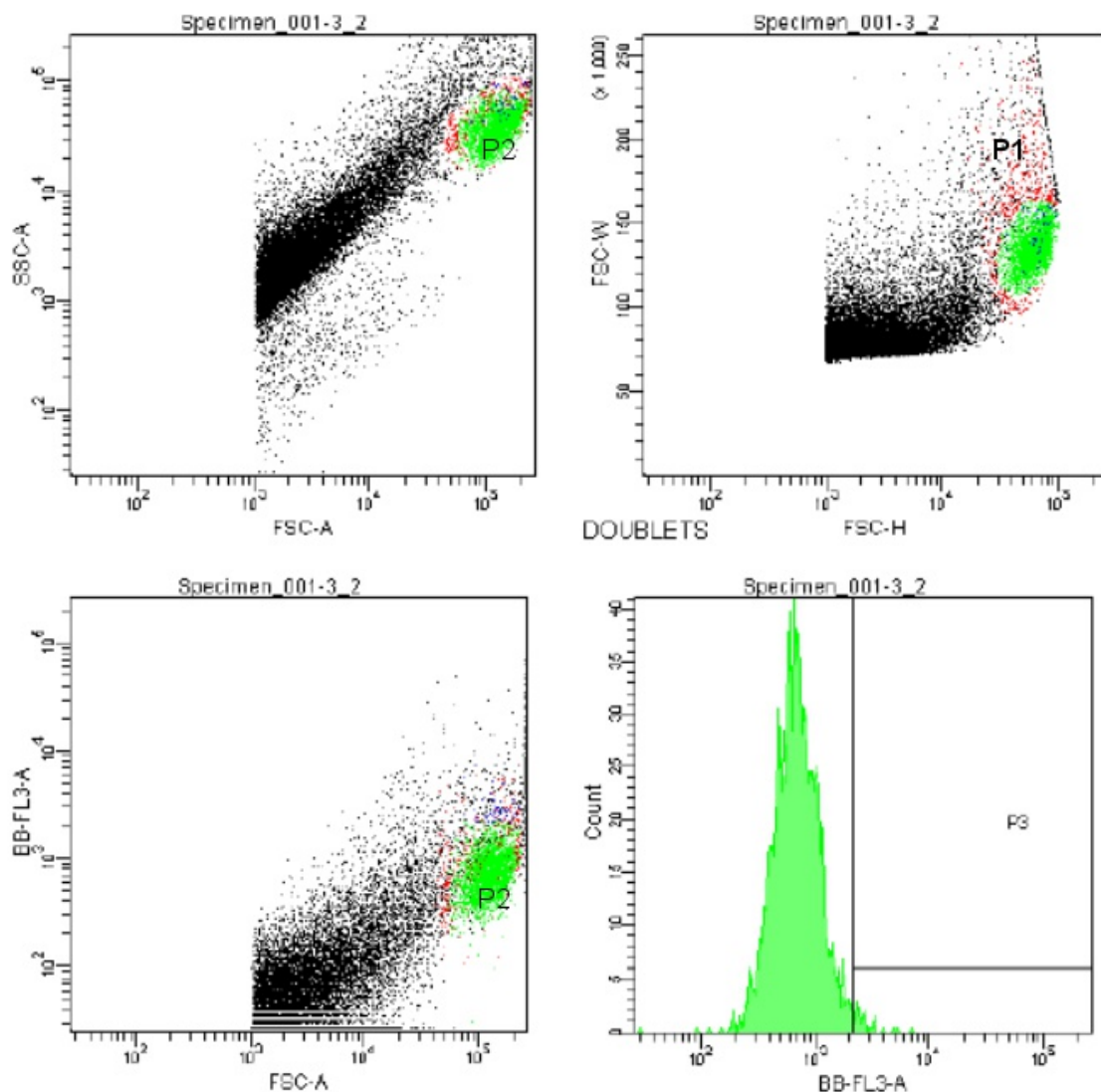
Získaná data pro buňky A549 jsou shrnuta na obrázcích 4.22, 4.23 a 4.24 a v tabulce 4.12. Z uvedených dat vyplývá, že jsme schopni detegovat buňky A549 vykazující vyšší fluorescenci, způsobenou interakcí neznačených buněk s fluorescenčně značenými bakteriemi *P. aeruginosa*. Dle kvantifikace v tab. 4.12 přibližně 14% buněk vykazuje interakci s *P. aeruginosa* (jako negativní kontrola slouží buňky A549 inkubované s neznačenou PA. V grafickém zobrazení můžeme pozorovat i volné bakterie spolu s buněčným detritem a nespecifickým šumem. V histogramu FSC-A zobrazujícím veškeré měřené částice lze pozorovat 2 vrcholy – levý vrchol okolo hodnoty 10^3 obsahuje volné bakterie, buněčný detritus a nespecifický šum (pro ilustraci uveden pouze u obrázku 4.22). Pro stanovení počtu volných bakterií by bylo třeba další optimalizace.



Obr. 4.22 Charakterizace samotných (seškrábaných) buněk A549 pomocí průtokové cytometrie. Odpovídá jednomu ze 4 stanovených paralelních vzorků. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A, z níž je pro další analýzu vybraná populace buněk A549 (P1, červená) a dále dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk. Dále histogramy FSC-A zobrazující veškeré měřené částice (vlevo dole), populaci P1 a populaci P2. Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence – P3 (modrá)



Obr. 4.23 Charakterizace buněk A549 inkubovaných s PA značenou PKH 26 pomocí průtokové cytometrie. Odpovídá reprezentativnímu ze 4 stanovených paralelních vzorků. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A, z níž je pro další analýzu vybrána populace buněk A549 (P1, červená) a dále dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk. Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A (PKH 26) a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence – P3 (modrá)



Obr. 4.24 Charakterizace buněk A549 inkubovaných s neznačenou PA pomocí průtokové cytometrie. Odpovídá reprezentativnímu ze 4 stanovených paralelních vzorků. Zobrazena je dot plot analýza FSC-A x SSC-A, z níž je pro další analýzu vybraná populace buněk A549 (P1, červená) a dále dot plot analýza FSC-H x FSC-W, v níž je vybrána populace P2 (zelená) obsahující pouze jednotlivé buňky bez dubletů a shluků buněk. Dále dot plot analýza FSC-A x FL3-A a histogram intenzity fluorescence populace P2 v FL3 s vyznačenou oblastí vyšší fluorescence – P3 (modrá)

Tabulka 4.12 Vyhodnocení dat z průtokového cytometru pro buňky A549.

	A549 kontrolní škrábané		A549 - PA neznačené		A549 - PA značené	
	Průměrná hodnota (n=4)	Standardní odchylka	Průměrná hodnota (n=4)	Standardní odchylka	Průměrná hodnota (n=4)	Standardní odchylka
Celkový počet detegovaných částic	20000		20000		20000	
Počet analyzovaných buněk A549 (P2)	5314	1111	2611	946	1993	440
Počet buněk A549 s vysokou fluorescencí (P3)	155 (2,9%)	36	56 (2,1%)	11	275 (14%)	67

Srovnání buněk A549 samotných, buněk A549 s PA bez fluorescenčního značení a buněk A549 s PA značenou PKH 26. Odpovídá obrázkům 4.22 – 4.24. Vybraná populace P2 obsahuje pouze jednotlivé buňky bez dubletů nebo shluků buněk. Procenta uvedená v závorkách jsou procenta ze sledovaného výběru (P2).

5 Diskuse

Cystická fibróza je geneticky podmíněné onemocnění, kde podstatou nemoci je chybné fungování proteinu CFTR, jehož funkcí je transport iontů (chloridový kanál). Chybné fungování tohoto proteinu sebou nese řadu změn oproti fyziologickému stavu organismu a zdravotních komplikací. Nejčastější příčinou úmrtí CF pacientů jsou zdravotní komplikace spojené s chronickou kolonizací dýchacích cest pacientů mikroorganismy (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* komplex). Z tohoto důvodu je studována adheze těchto mikroorganismů na buňky plicního epitelu pacientů a možnosti ovlivnění adheze. Protože léčba antibiotiky je komplikována zejména vznikem rezistencí, jsou hledány další možnosti terapie infekce *P. aeruginosa* - například využití slepičích protilátek jako agens pasivní imunizace,. Tato práce se zabývá zejména metodami vhodnými pro studium bakteriální adheze na buňky plicní tkáně.

Uvažováno bylo o využití buněk plicní tkáně získaných metodou „brushing“. Jedná se o neinvazivní techniku díky které je získána směsná buněčná kultura plicních buněk [74]. Jde však o primární až sekundární tkáňovou kulturu, která má pouze omezenou životnost (omezený počet dělení), její dlouhodobější kultivace je velmi náročná a navíc výtěžek je poměrně malý. Z toho důvodu nebyly po provedení pilotních studií tyto buňky získané od pacientů ve spolupráci s FN Motol používány pro studium bakteriální adheze. Pro experimenty v této práci byly využívány stabilní linie – jednak nádorová linie A549 a také imortalizované buňky izolované z plicní tkáně zdravého (NuLi-1) a CF jedince (CuFi-1). Linie A549 byla využívána zejména pro optimalizace metod, imortalizované linie jako relevantní předmět studia a srovnání adheze bakterií na CF a non-CF plicní buňky.

Důležitým krokem je objektivní kvantifikace plicních buněk a bakterií, v této práci je využívána kvantifikace pomocí fluorescence. Vhodné sloučeniny pro fluorescenční značení byly zkoušeny v bakalářské práci, kde byla provedena optimalizace pro námi používané buňky a bakterii *P. aeruginosa* [39]. Pro značení *P. aeruginosa* byla používána sloučenina PKH 26 a pro značení plicních buněk sloučenina PKH 67.

V experimentech pro studium adheze bylo nutné vyřešit optimální poměr plicních buněk a bakterií a dobu inkubace. Doba inkubace byla v našem případě optimalizována na 2 h, bývá uváděna inkubace i 0,5 h – 4 h [70]. Obdobně nacházíme různý poměr buněk a bakterií - 1:50 – 1:1000 [77]. V této práci byl používán poměr plicních buněk a bakterií 1:100 pro experimenty hodnocené pomocí spektrofluorimetru a pro experimenty hodnocené na průtokovém cytometru poměr 1:200. Obě hodnoty se ukázaly jako relevantní. Adheze *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně byla hodnocena jednak s využitím průtokové cytometrie a pak také metodou duální kvantifikace fluorescence obou komponent modelového systému na spektrofluorimetru Tecan Infinite. Tyto objektivní metody hodnocení byly doplněny mikroskopií s využitím fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse.

Průtoková cytometrie je v současné době velmi rozšířená metoda pro kvantifikaci buněk s možností určení dalších parametrů jako je například fluorescence. Používána byla linie A549 a *P. aeruginosa* značená PKH 26. Během experimentu se ukázalo, že sloučenina PKH 26 není pro použití na cytometrii zcela vyhovující, protože běžně používané lasery mají fixní vlnovou délku. Laser pro námi sledovanou oblast má 488 nm, což je poměrně daleko od excitačního maxima sloučeniny PKH 26 (maximum 551 nm, nárůst excitačního vrcholu je zhruba od 510 – 520 nm), nedochází tak v případě značené *P. aeruginosa* k optimální excitaci a získaný signál emise tak je nižší. I proto byl v adhezním testu používán vyšší poměr buněk bakterií – 1:200. Základním nedostatkem průtokové cytometrie pro naši aplikaci je fakt, že se měří buněčná suspence – bylo tedy třeba vyřešit vhodné převedení námi používaných adherentních linií do suspence. Zkoušen byl krok trypsinizace (jako při běžné subkultivaci) a také mechanické uvolnění buněk z povrchu za použití speciální škrabky pro tkáňové kultury. Ačkoli je trypsinizace v této souvislosti běžně používána [78], lze předpokládat, že tento krok bude mít vliv na adhezi bakterií na buňky. V případě trypsinizace dochází k uvolnění části navázaných bakterií (detegovaná fluorescence je prokazatelně nižší), což se v případě mechanického uvolnění buněk seškrábáním děje v mnohem menší míře (vyšší fluorescence při stejném poměru buněk a bakterií, stejné době inkubace a počtu promývacích kroků jako u trypsinizace). Proto bylo pro převedení buněk do suspence využito mechanického uvolnění buněk z povrchu. Měřením na průtokovém cytometru byla získána data o tom, kolik buněk z námi vybraného

souboru vykazuje vyšší fluorescenci, která je výsledkem interakce neznačených plicních buněk s fluorescenčně značenými bakteriemi. Tato hodnota je ovšem jak již bylo uvedeno ovlivněna ne zcela dostačující excitací *P. aeruginosa* značených PKH 26. Použití průtokové cytometrie pro vyhodnocení adhezních testů by tedy vyžadovalo vyzkoušet některé z dalších dostupných fluorescenčních sloučenin jako např. DiOC6, Hoescht. Hlavní podmínkou pro jejich použití je otázka zda nedojde k ovlivnění povrchových struktur nebo usmrcení značených bakterií, což je klíčové pro adhezní testy.,

Měření na spektrofleurimetru byla zkoušena již při optimalizaci a výběru našeho modelového systému plicních buněk a *P. aeruginosa* [39]. Používán byl spektrofleurimetr Tecan Infinite M200 Pro (s programem i-control), který umožňuje celou řadu stanovení, mimo jiné právě fluorescenci. Výhodou je možnost nastavení přesné vlnové délky pro excitaci i emisi, typ destičky i mnohonásobné čtení jamek. Umožňuje také proměření excitačních a emisních spekter jednotlivých fluorescenčních sloučenin při různém nastavení, čehož bylo využito při optimalizaci nastavení pro náš modelový systém. V experimentech tak byly používány optimalizované hodnoty excitační a emisní vlnové délky pro PKH 26 a PKH 67, které se liší od maxim doporučených výrobcem.

Měření na spektrofleurimetru umožňuje ponechat buňky adherované na povrch destičky a není nutné je převádět do suspence. Adheze bakterií je tak sledována na monovrstvě buněk, které simulují plicní tkáň a celé uspořádání je tak velmi podobné reálnému stavu v dýchacím systému CF pacienta (kolonizace dýchacích cest, zejména epitelální vrstvy buněk). Oproti průtokové cytometrii je třeba fluorescenčně značit i linie plicních buněk pro duální kvantifikaci obou komponent systému, používány byly ovšem sloučeniny, které zachovávají buňky životaschopné (po delší dobu, minimálně 1 týden) a nedochází k výraznému pozměnění buněk. Kvantifikace fluorescence pomocí spektrofleurimetru byla doplněna také mikroskopickým hodnocením, které nám zprostředkovalo další možný pohled na adhezi bakterií na buňky a umožnilo si vytvořit názor na reálnou situaci na jamkách destičky (mobilita bakterií, tvorba slizové vrstvy). V hodnocení dat získaných ze spektrofleurimetru je používán poměr jednotlivých fluorescencí (buněk a bakterií) pro stanovení vlivu jednotlivých agens, ačkoli byly měřeny i kalibrace pro všechny typy buněk i bakterie pro možnost přepočtu fluorescence na

množství buněk. Vyjádření pomocí poměru fluorescencí je přesnější, vyjádření počtu bakterií na jednu buňku je možné, tento výpočet je však zkreslen zaokrouhlením a dvěma přepočty z kalibračních vztahů. Z tohoto důvodu není ve výsledcích práce uváděn.

Pro náš modelový systém je tedy vhodnější metodou vyhodnocení adheze *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně duální kvantifikace fluorescence obou komponent za pomoci spektrofleurimetru Tecan Infinite doplněná mikroskopickým hodnocením. Hlavními důvody jsou možnost měření všech vzorků s minimální časovou prodlevou (změření celé jedné destičky pro danou fluorescenci trvá přibližně 3-4 minuty), můžeme stanovit buňky adherované na povrch (není nutný převod do suspense) a díky možnosti nastavit jednotlivé vlnové délky je zajištěna optimální excitace i emise obou použitých fluorescenčních sloučenin a nedochází tak k možnému zkreslení výsledku jako v případě stanovení průtokovou cytometrií.

Kromě srovnání metod hodnocení adheze byl dále sledován vliv vybraných agens na adhezi *P. aeruginosa*. Použity byly sacharidy, ke kterým jsou specifické bakteriální lektiny (D-galaktosa – PA-IL; L-fukosa - PA-IIL). Lektiny jsou jedním z důležitých virulenčních faktorů *P. aeruginosa* i dalších mikroorganismů a podílí se nejen na adhezi na hostitelské buňky ale i na tvorbě biofilmu [80]. Ze získaných výsledků je patrné, že vliv těchto monosacharidů na adhezi *P. aeruginosa* není výrazný. Důvodem nízkého vlivu monosacharidů na adhezi může být jednak poměrně krátká inkubace, lze tedy zvážit delší preinkubaci bakterií se sacharidy [81], nebo také fakt, že oligomerní komplexy jsou silnějšími inhibitory než monosacharidy [82], které naopak mohou sloužit jako zdroj energie bakterií. V současné době studované potenciální inhibitory lektinů *P. aeruginosa* jsou zejména glykopeptidy [80]. Použití monosacharidů tedy není zřejmě vhodné pro ovlivnění adheze *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně.

Dále byl sledován vliv slepičích protilátek na adhezi *P. aeruginosa*. Slepičí protilátky typu IgY (z vaječného žloutku) jsou v současné době hodně studovány jako potenciální agens pro pasivní imunizaci u řady zdravotních komplikací způsobených mikroorganismy a také jako profylaktická imunoterapie [83]. Například testování IgY protilátek proti *Candida spp.* a *Candida albicans* na buňkách epitelu dutiny ústní [84] je příklad analogický k naší studii.

V naší práci byla sledována jednak kontrolní protilátka (4K) a pak zejména protilátka specifická vůči lektinu PA-IIL *P. aeruginosa* (4S) [85]. Ze získaných dat je jasné patrné, že kontrolní protilátka není schopná bránit adhezi, naopak množství bakterií na plicních buňkách bylo naměřeno vyšší. Vyšší signál fluorescence pro *P. aeruginosa* ovlivněné kontrolní protilátkou 4K oproti všem ostatních sledovaným agens je pravděpodobně způsoben mírným namnožením bakterií v přítomnosti protilátky. Vzhledem k datům získaných z experimentů byl proveden analogický experiment (stejně množství buněk a bakterií 1:100, inkubace 2h), kdy byla měřena pouze absorbance (optická denzita) při 600 nm v čase 0 a po 2 h inkubace. Po 2 hodinách inkubace za laboratorní teploty došlo k nárůstu OD₆₀₀ o 0,020 v případě kontrolní protilátky, naopak u neovlivněných PA nebo PA se sacharidy byl tento nárůst 0,005 – 0,010, čemuž odpovídal i obdobný nárůst fluorescence. Tento jev je pravděpodobně způsoben dělením bakterií až po fluorescenčním označení, kdy s bakteriemi není po dobu 2h inkubace manipulováno (centrifugace, fluorescenční značení) a určité procento bakterií se rozdělí, což vede k mírnému nárůstu fluorescence. Jak bylo zmíněno výše, tento mírný nárůst je v menší míře pozorovatelný i u inkubace bez ovlivnění PA a inkubaci s monosacharidy. Lze předpokládat, že v adhezním testu pak dojde k zachycení o něco většího množství bakterií na buňky než je například v případě neovlivněných PA, což odpovídá vyššímu signálu fluorescence.

Klíčovým sledovaným agens však byla protilátka specifická vůči bakteriálnímu lektinu PA-IIL, který je jedním z důležitých virulenčních faktorů bakterie [81]. V případě této specifické protilátky 4S byl jednoznačně patrný její vliv na adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně. U bakterií inkubovaných s protilátkou 4S byl detegován prokazatelně nižší signál fluorescence odpovídající množství navázaných bakterií a tento vliv byl jasné patrný i při mikroskopickém hodnocení, kde ve srovnání s ostatními agens bylo pozorováno jednoznačně nižší množství bakterií, které vykazovaly vyšší mobilitu, což značí nižší adhezi na plicní buňky a vede nás k tvrzení, že slepičí protilátka 4S specifická vůči bakteriálnímu lektinu je schopna účinně bránit adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu.

V této práci byly studovány z hlediska adheze *P. aeruginosa* jednak plicní buňky zdravého jedince – line NuLi-1 a také buňky CF pacienta – linie CuFi-1. V případě CF linie CuFi-1 bylo detegováno vyšší množství navázaných bakterií oproti kontrolní linii

NuLi-1, což je v souladu s předpokladem, že na CF linii bude vazba bakterií vyšší vzhledem k přítomnosti pozměněných povrchových struktur, zejména glykokonjugátů. Nejedná se však velmi výrazný rozdíl. Dále je v případě CuFi-1 linie možné pozorovat nepatrný vliv sacharidů, který vede k nižšímu počtu navázaných bakterií než v případě linie NuLi-1. To by odpovídalo blokování vazných míst lektinu alespoň v nějaké míře a tedy nižší vazbě na pozměněné povrchové glykokonjugáty CF buněk oproti linii NuLi-1 zdravých buněk.

Cíle práce optimalizovat provedení adhezních testů v systému bakterie (*P. aeruginosa*) a buňky plicní tkáně (A549, NuLi-1, CuFi-1), srovnat možné metody hodnocení těchto adhezních testů a prokázat vliv vybraných agens na adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně byly splněny.

6 Shrnutí

- Byla provedena optimalizace metodiky adhezních testů v systému bakterie – plicní buňky. Používány byly linie A549, NuLi-1a CuFi-1 a kontrolní kmen bakterie *P. aeruginosa*.
- Byly srovnány možné metody vyhodnocení adhezních testů s využitím kvantifikace pomocí fluorescence a to měření za pomoci průtokové cytometrie, spektrofluorimetru a mikroskopického hodnocení.
- Jako vhodná metoda odpovídající stavu v organismu bylo určeno stanovení fluorescence pomocí spektrofluorimetru Tecan Infinite doplněné o mikroskopické hodnocení. Plicní buňky byly značeny sloučeninou PKH 67 a *Pseudomonas aeruginosa* byla značena pomocí PKH 26.
- Studován byl vliv vybraných agens na adhezi *P. aeruginosa* na buňky plicní tkáně a z těchto agens se jako nejvhodnější ukázala slepičí protilátka 4S, specifická vůči bakteriálnímu lektinu PA-IIL, která je prokazatelně schopna adhezi bránit. Použití této protilátky snížilo množství bakterií na plicních buňkách o 30%, v případě linie CuFi-1 pak o více než 50% oproti neošetřené kontrole.

7 Seznam použité literatury

Seznam použité literatury

- 1: Vávrová Věra a kol., Cystická fibróza. Grada Publishing 2006
- 2: <http://www.eurogentest.org/index.php?id=448>, červenec 2013
- 3: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1002/med100225.html>, 2001
- 4: Rosenstein B., Zeitlin P., Lancet 1998; 351: 277-282
- 5: Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C., Science 1989; 245: 1078-1080
- 6: Cuthbert A. W., Br. J. Pharmacol. 2010; 163: 173-183
- 7: Keating C. L., Liu X., DiMango E. A., Chest 2010; 137 (5): 1157-1163
- 8: <http://www.cftr.info/about-cf/role-of-ctfr-in-cf/genetics-and-cell-biology-of-cftr/cftr-structure-and-regulation/>, červenec 2013
- 9: Kreda S. M., Mall M., Mengos A., Rochelle L., Yankaskas J., Riordan J.R., Boucher R.C., Mol. Biol. Cell 2005; 16: 2154-2167
- 10: Bush A., Götz M., Eur. Respir. Mon. 2006; 37: 234-290
- 11: Skalická V., Fila L., Zemková D., Smolíková L., Vávrová V., Postgrad. Med. 2010; 07: 817-824
- 12: Hodson M. E., Geddes D. M., Cystic fibrosis, 2nd ed. London: Arnold
- 13: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cystic_fibrosis_manifestations.png, červenec 2013
- 14: Gibson L. E., Cooke R. E., Pediatrics 1959; 23: 545-549
- 15: Balaščíková M., Holubová A., Piskáčková T., Čes-slov. Pediat. 2008; 2: 62-75
- 16: Castellani C., Southern K. V., Brownlee K., a kol., J. Cyst. Fibros. 2009; 8: 153-173
- 17: Balaščíková M., Holubová A., Skalická V., Zemková D., Kracmar P., Gonsorčíková L., Camajová J., Piskáčková T., Lebl J., Dřevínek P., Gregor V., Vávrová V., Votava F., Macek M. Jr., J. Cyst. Fibrosis 2009; 8: 224-227
- 18: Elborn J.S., Hodson M., Bertram C., J. Cyst. Fibrosis 2009; 8: 211-217
- 19: Chernish R. N., Aaron S. D., Curr. Opin. Pulm. Med 2003; 9: 509-515
- 20: http://www.cff.org/Display/dsp_ClinicalResearchHTML.cfm?id=328, červenec 2013
- 21: Medical Tribune CZ, s.r.o., Medical Tribune 2013; 9(4): sešit B
- 22: Ramsey B. W., Davies J., McElvaney N. G., Tullis E., Bell S. C., Dřevínek P., Griesse M., McKone E. F., Wainwright C. E., Konstan M. W., Moss R., Ratjen F., Sermer-Gaudelus I., Rowe S. M., Doug Q., Rodriguez S., Yen K., Ordonez C., Elborn J. S., VX08-770-102 Study group, N. Engl. J. Med. 2011; 365(18): 1663-1672
- 23: Liou T. G., Adler F. R., Cox D. R., Cahill B. C., N. Engl. J. Med. 2007; 357(21): 2143-2152
- 24: Kamei A., Pier G. B., Goldberg J. B., Coutinho-Sledge Y. S., Priebe G.P., Infect. Immun. 2011; 79: 1289-1299
- 25: Stríž I., Interní Med. 2008; 10: 184-187
- 26: Stríž I., Mio T., Adachi Y., Romberger D.J., Rennard S.I., Immunol. Lett. 1999; 70: 83-88
- 27: Jame A. J., Lackie P.M., Cazaly A. M., Sayers I., Penrose J.F., Holgate S.T., Sampson A.P., Clin. Exp. Allergy 2007; 37: 880-892

- 28: Mio T., Liu X. D., Stříž I., Adachi Y., Sköld C.M., Romberger D.J., Spurzem J.R., Illing M.G., Ertl R., Rennard S.I., *Am. J. Physiol.* 1998; 274: 119-126
- 29: Griese M., Birrer P., Demirsoy A., *Eur. Resp. J.* 1997; 10: 1983-1988
- 30: Restrepo C. I., Dong Q., Savov J., Mariencheck W.I., Wright J.R., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; 21: 576-585
- 31: <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/4854/>, červenec 2013
- 32: Döring G. , *Eur. Respir. Mon.* 2006; 35: 1-20
- 33: http://a549.com/a549_cell_culture.html,
- 34: <http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Global/Products/D/A/D/6/CCL-185.aspx>, červenec 2013
- 35: Zabner J., Karp P., Seiler M., Phillips S. L., Mitchell C. J., Saavedra M., Welsh M., Klingelhutz A. J., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003; 284(5): L844-854
- 36: <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx>, červenec 2013
- 37: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4013.aspx>, červenec 2013
- 38: Kammouni W., Moreau B., Becq F., Saleh A., Pavirami A., Figarella C., Merten M. D., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 20: 684-691
- 39: Nosková, L.: Bakalářská práce. PřF UK, Praha 2011
- 40: Bals R., Weiner D. J., Wilson J. M., *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 303-307
- 41: Hořejší V., Bartůňková J., *Základy imunologie*. Triton 2009
- 42: Carlsson M., Sjöholm A. G., Eriksson L., Thiel S., Jensenius J.C., Segelmark M., Truedsson L., *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 139: 306-313
- 43: Bodas M., Vij N. , *Discov. Med.* 2010; 9(47): 346-356
- 44: Warr G. W., Magor K. E., Hoggins D. A., *Immunol. Today* 1995; 16: 392-398
- 45: Suzuki N., Lee Y. C. , *Glycobiology* 2004; 14(3): 275-292
- 46: http://www.good-biotech.com/about_us/index.php?id=7, červenec 2013
- 47: Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y., Erf G. F., *Poult. Sci.* 2006; 85(8): 1364-1372
- 48: Nilson E.: Characterisation of IgY for oral Immunotherapy and Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections in Cystic fibrosis patients: disertační práce. Uppsala University Uppsala 2009
- 49: <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, červen 2013
- 50: Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Fiandaca M. J., Pedersen J., Hansen C. R., Andersen C. B., Pressler T., Givskov M., Høiby N., *Pediatr. Pulmonol.* 2009; 44(6): 547-558
- 51: Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T., *Future Microbiol.* 2010; 5(11): 1663-1674
- 52: Høiby N., *BMC Med.* 2011; 9: 32
- 53: Zinger-Yosovich K. D., Gilboa-Garber N., *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 6908-6913
- 54: Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K. E. , *Microbiology* 2005; 151: 1313-1323
- 55: http://en.wikipedia.org/wiki/Sialyl-Lewis_X, červenec 2013
- 56: Wu A. M., Wu J. H., Singh T., Liu J.-H., Tsai M.-S., Gilboa-Garber N., *Biochimie* 2006; 88: 1479-1492
- 57: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia.html>, červen 2013
- 58: <http://www.burkholderia.com>, 10.3.2011
- 59: Isles A., Maclusky I., Corey M., Gold R., Prober C., Fleming P., Levison H., *J. Pediatr.* 1984; 104: 206-210
- 60: Kalish L. A., Waltz D. A., Dovey M., Potter-Bynoe G., McAdam A.J., Lipuma J.J.,

- Gerard C., Goldmann D., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173: 421-425
- 61: Sist P., Cescutti P., Skerlavaj S., Urbani R., Leitao J.H., Sá-Correia I., Rizzo Rl., *Carbohydr. Res.* 2003; 338: 1861-1867
- 62: Frangolias D. D., Mahenthiralingam E., Rae S., Raboud J.M., Davidson A.G., Wittmann R., Wilcox P.G., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1572-1577
- 63: Lameignere E., Malinovská L., Sláviková M., Duchaud E., Mitchell E. P., Varrot A., Šedo O., Imberty A., Wimmerová M., *Biochem. J.* 2008; 411(2): 307-318
- 64: Lameignere E., Shiao T. C., Roy R., Wimmerová M., Dubreuil F., Varrot A., Imberty A., *Glycobiology* 2010; 20(1): 87-98
- 65: Šulák O., Cioci G., Delia M., Lahmann M., Varrot A., Imberty A., Wimmerová M., *Structure* 2010; 18(1): 59-72
- 66: Šulák O., Cioci G., Lameignere E., Balloy V., Round A., Gutsche I., Malinovská L., Chignard M., Kosma P., Aubert D. F., Marolda C. L., Valvano M. A., Wimmerová M., Imberty A., *PLoS Pathog.* 2011; 7(9): e1002238
- 67: Schwab U. E., Wold A. E., Carson J. L., Leigh M.W., Cheng P.W., Giligan P.H., Boat T.F., *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148: 365-369
- 68: Lambiase A., Catania M. R., Del Pezzo M., Rossano F., Terlizzi V., Sepe A., Raia V., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(18): 973-980
- 69: Carterson A. J., Höner zu Bentrup K., Ott C. M., Clarke M. S., Pierson D. L., Vanderburg C.R., Buchanan K. L., Nickerson C. A., Schurr M. J., *Infect. Immun.* 2005; 73(2): 1129-1140
- 70: Chi E., Mehl T., Nunn D., Lory S., *Infect. Immun.* 1991; 59: 822-828
- 71: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/use-of-antibiotics-and-antimycotics.html>, červen 2013
- 72: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Transfection/Selection/g418.html>, červen 2013
- 73: Fulcher L. M.; Gabriel S.; Burns K. A.; Yankaskas J. R.; Randell S. H., *Human Cell Culture Protocols Chapter 13-14*. Humana Press Inc., NY 2005
- 74: Kelsen S. G., Mardini I. A., Benovic J. L., Zhou S., Higgins N.C., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7: 66-72
- 75: Scharfman A., Kroczyński H., Carnoy C., Van Brussel E., Lamblin G., Ramphal R., Roussel P., *Infect. Immun.* 1996; 64: 5417-5420
- 76: Wong S. M., Chu W., Sun D., Huang H.S., Chen J.H., Tsai P.J., Lin N.T., Yu M.S., Hsu S.F., Wang S.L., Chang H.H., *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 6111-6116
- 77: Adamou J. E., Wizeman T. M., Barren P., Langermann S., *Infect. Immun.* 1998; 66(2): 820-822
- 78: Bérubé L. R., Jouishomme H., Jarrel H. C., *Can. J. Microbiol.* 1998; 44: 448-455
- 79: Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv, *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada Publishing, a.s. 2005
- 80: Kadam R. U., Bergmann M., Hurley M., Garg D., Cacciarini M., Swiderska M. A., Nativi C., Sattler M., Smyth A. R., Williams P., Cámara M., Stocker A., Darbre T., Reymond J. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011; 50: 10631-10635
- 81: Chemani Ch., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B. P., Faure K., *Infect. Immun.* 2009; 77(5): 2065-2075
- 82: Rachmaninov O., Zinger-Yosovich K. D., Gilboa-Garber N., *Nutr. J.* ; 11: 10
- 83: Neri P., Tokoro S., Kobayashi R., Sugiyama T., Umeda K., Shimizu T., Tsuji T.,

- Kodama Y., Oguma K., Mori H., PLoS ONE 2011; 6(10): e26526
- 84: Fujibayashi T., Nakamura M., Tominaga A., Satoh N., Kawarai T., Narisawa N., Shinozuka O., Watanabe H., Yamazaki T., Senpuku H., Jpn. J. Infect. Dis. 2009; 62(5): 337-342
- 85: Růžicka, M.: Diplomová práce. PřF UK, Praha 2010

Přílohy

Příloha 1 Produktové listy linií NuLi-1 a CuFi-1

Produktové listy linií NuLi-1 a CuFi-1 obsahují základní charakteristiky linií (jako je například doba zdvojení, doporučený počet subkulturací, etc) a také doporučený postup práce s těmito liniemi, který byl v této práci používán. Informace shodné pro obě linie jsou uvedeny pouze jednou.

347677



Product Information Sheet for ATCC[®] TM

Product **ATCC-CRL-4011**

Lot Number 7372310

99

ATCC Catalog No.: CRL-4011

Lot No.: 7372310

Designation: NuLi-1

Description: Bronchial Epithelium; Human

Total Cells/mL: 1.0×10^6

Expected Viability: 65%

Ampule Passage No.: 15

Population Doubling (PDL): N/A

Dilute Ampule Content: 1:10 into one T-25 flask

Volume/Ampule: 1 mL

Date Frozen: 07/07/2006

A T-25 setup at a seeding density of 2.0×10^4 viable cells/cm² reaches approximately 20% confluence in 1 day.

American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209

For technical enquiries in Europe contact:
LGC Standards
E-mail: atcc-tech@lgcstandards.com
Telephone: +44(0)20 8943 8489
Fax: +44(0)20 8943 8405
web site: www.lgcstandards-atcc.org

Product Information Sheet for ATCC[®] TM

Product **ATCC-CRL-4013**

Lot Number 5014414

99

Designation: CuFi-1 Description: Bronchial Epithelium
Total Cells/mL: 1.9×10^6 (6)
Expected Viability: 90%
Ampule Passage No.: 18
Population Doubling (PDL): Unknown
Dilute Ampule Content: 1:15 into one T-75 Flask
Volume/Ampule: 1.0 mL
Date Frozen: 09/06/06

American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209

For technical enquiries in Europe contact:
LGC Standards
E-mail: atcc-tech@lgcstandards.com
Telephone: +44(0)20 8943 8489
Fax: +44(0)20 8943 8405
web site: www.lgcstandards-atcc.org



Product Information Sheet for ATCC® CRL-4011™

Name: NuLi-1
ATCC® No: CRL-4011™

Biosafety Level: 2
Depositor: A.J.Klingelutz
Organism: *Homo sapiens* (human)
Age: 36 years old
Gender: male
Source: Tissue: epithelium; lung; bronchus normal
Immortalization Method: E6/E7 and hTERT expression
Observed Morphology: epithelial-like
Growth Properties: adherent
Longevity: >15 PDLs post-cryopreservation recovery
Doubling Time: about 43 hours
Antigen Expression: Positive for the cytokeratin epithelial marker (Flow cytometry)
DNA Profile: (STR analysis)
CSF1PO: 11
D13S317: 10,12
D16S539: 8,13
D5S818: 11,13
D7S820: 12,13
TH01: 9,3
TPOX: 8,11
vWA: 14,18
Amelogenin: X,Y

Cytogenetic Analysis: This is a near-diploid human cell line of male origin with a polyploidy rate of 24%. There were copies of karyotypically normal X and Y-chromosomes present in most of the cells analyzed. Overall, some of the cells contained chromosomal abnormalities, with the most consistent being trisomy 5 and 20.

Comments:

Human airway epithelial (HAE) cell line, NuLi-1, was derived from normal lung of a 36-year-old patient by dual retroviral infection with HPV-16E6/E7-LXSN [PubMed: 1845902] and hTERT-LXSN [PubMed: 9817205]. Consequently, the cells do not undergo growth arrest in cell culture due to exogenous expression of the telomerase and E6/E7 genes. NuLi-1 cells (wild type) do not express the delta F508 cystic fibrosis-causing mutation. Another hTERT-immortalized cell line, derived from HAE of a cystic fibrosis patient is also available as ATCC® CRL-4013™ (CuFi-1). Both cell lines, when seeded on semi-permeable filters and grown at the air-liquid interface, are capable of forming polarized differentiated epithelia that exhibit transepithelial resistance and maintain the ion channel physiology expected of each genotype. These cell lines may be useful models for studying ion

physiology, therapeutic interventions for cystic fibrosis and innate immunity [PubMed: 12676769].

As part of our quality control, we have tested this cell line for its ability to grow for a minimum of 15 population doublings after recovery from cryopreservation. We have also compared its karyotype, telomerase expression level, growth rate, morphology and tissue-specific markers when first recovered from cryopreservation with that of cells at 10+ population doublings to ensure that there is no change in these parameters and that the cells are capable of extended proliferation.

Complete Growth Medium

These cells are grown in a serum-free medium: BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium, Serum-free) from Cambrex (BEGM Bullet Kit; CC-3170) made of BEBM basal medium and SingleQuot additives (ATCC does not use gentamycin-amphotericin B) supplemented with 50µg/ml G-418.

Atmosphere: air, 95%; CO₂, 5%

Recovery of Frozen Cells

To ensure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If storage of the frozen culture is necessary upon arrival, store the vial in liquid nitrogen vapor phase and **NOT** at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

SAFETY PRECAUTION: Always use protective gloves and clothing and wear a full face mask when handling frozen vials. Some vials leak when immersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Note: The culture flasks should be pre-coated with 60µg/ml solution of Human Placental Collagen Type VI. (Sigma Cat. No. C-7521) at least 18 hours in advance then air-dried and rinsed 2-3 times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

1. Prepare a 25-cm² or a 75-cm² culture flask containing the recommended complete culture medium. Prior to the addition of the vial contents, the vessel containing the growth medium should be placed in the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6) and to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells.
2. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
3. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
4. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 ml of complete culture medium and centrifuge the

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.



Product Information Sheet for ATCC® CRL-4013™

Name: CuFi-1

ATCC® No: CRL-4013™

Biosafety Level: 2

Depositor: A.J.Klingelutz

Organism: *Homo sapiens* (human)

Age: 14 years old

Gender: female

Source: Tissue: epithelium; lung; bronchus; cystic fibrosis

Immortalization Method: E6/E7 and hTERT expression

Observed Morphology: epithelial-like

Growth Properties: adherent

Longevity: >15 PDLs post-cryopreservation recovery

Doubling Time: about 26 hours

Antigen Expression: Positive for the cytokeratin epithelial marker (Flow cytometry)

DNA Profile: (STR analysis)

CSF1PO: 12
D13S317: 11,13
D16S539: 11,14
D5S818: 12
D7S820: 8,11
TH01: 6,9,3
TPOX: 8,11
vWA: 17,20
Amelogenin: X

Cytogenetic Analysis: This is a near-diploid human cell line of female origin with a modal chromosome count of 46 and a polyploidy rate of 27%. There were two copies of a karyotypically normal X-chromosome present in most of the cells. Overall, some of the cells contained chromosomal abnormalities, with most consistent being trisomy 20.

Comments:

Human airway epithelial (HAE) cell line, CuFi-1, was derived from lung of a 14-year-old patient with cystic fibrosis by dual retroviral infection with HPV-16E6/E7-LXSN [PubMed: 1845902] and hTERT-LXSN [PubMed: 9817205]. Consequently, the cells do not undergo growth arrest in cell culture due to exogenous expression of the telomerase and E6/E7 genes. CuFi-1 cells are homozygous for the delta F508 cystic fibrosis-causing mutation (delta F508/delta F508). Another hTERT-immortalized cell line, derived from normal HAE is also available as ATCC® CRL-4011™ (NuLi-1). Both cell lines, when seeded on semi-permeable filters and grown at the air-liquid interface, are capable of forming polarized differentiated epithelia that exhibit transepithelial resistance and maintain the ion channel physiology expected of each genotype. These cell lines may be useful models for

studying ion channel physiology, therapeutic interventions for cystic fibrosis and innate immunity [PubMed: 12676769].

As part of our quality control, we have tested this cell line for its ability to grow for a minimum of 15 population doublings after recovery from cryopreservation. We have also compared its karyotype, telomerase expression level, growth rate, morphology and tissue-specific markers when first recovered from cryopreservation with that of cells at 10+ population doublings to ensure that there is no change in these parameters and that the cells are capable of extended proliferation.

Complete Growth Medium

These cells are grown in a serum-free medium: BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium, Serum-free) from Cambrex (BEGM Bullet Kit; CC-3170) made of BEBM basal medium and SingleQuot additives (ATCC does not use gentamycin-amphotericin B) supplemented with 50µg/ml G-418.

Atmosphere: air, 95%; CO₂, 5%

Recovery of Frozen Cells

To ensure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If storage of the frozen culture is necessary upon arrival, store the vial in liquid nitrogen vapor phase and **NOT** at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

SAFETY PRECAUTION: Always use protective gloves and clothing and wear a full face mask when handling frozen vials. Some vials leak when immersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Note: The culture flasks used should be pre-coated with 60µg/ml solution of Human Placental Collagen Type VI. (Sigma Cat. No. C-7521) at least 18 hours in advance then air-dried and rinsed 2-3 times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

1. Prepare a 25-cm² or a 75-cm² culture flask containing the recommended complete culture medium. Prior to the addition of the vial contents, the vessel containing the growth medium should be placed in the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6) and to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells.
2. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
3. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.



Product Information Sheet for ATCC® CRL-4011™ NuLi⁺ CRL-4013 C₁F₁

- cell suspension at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
5. Discard the supernatant and resuspend the cells in fresh growth medium (see the batch-specific information for the recommended dilution ratio). Add this suspension to the prepared culture vessel.
 6. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator.
 7. A 5% CO₂/95% air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

Receiving Flask Cultures

The flask was seeded with cells, incubated, and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).

1. If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
2. If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 ml of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.

Subculturing Procedure

Note: The culture flasks should be pre-coated with 60 µg/ml solution of Human Placental Collagen Type VI. (Sigma Cat. No. C-7521 or equivalent) at least 18 hours in advance then air-dried and rinsed 2-3 times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

Volumes are given for a 75-cm² flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes.

1. Remove and discard culture medium.
2. Add 2.0 to 3.0 ml of 0.25% (w/v) trypsin-0.53 mM EDTA solution to the flask and observe cells under an inverted microscope until the cell layer is dispersed (usually within 5 to 10 minutes).

Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Place at 37°C to facilitate dispersal.

3. To remove trypsin-EDTA solution, add 2.0 to 3.0 ml of 1% FBS in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline and aspirate cells by gently pipetting.
4. Transfer cell suspension to a 15-ml centrifuge tube and spin at approximately 125 x g for 5 to 10 minutes.
5. Discard supernatant and resuspend cells in fresh growth medium. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels. An inoculum of 9×10^3 to 1.5×10^4 viable cells/cm² is recommended. Subculture when reaching a concentration between 4×10^4 and 5×10^4 viable cells/cm².

6. Incubate cultures at 37°C.

Subcultivation Ratio: 1: 5

Medium Renewal:

Every 2 to 3 days (do not exceed 3 days)

For more information on enzymatic dissociation and subculturing of cell lines consult Chapter 12 in *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney (7).

Cryopreservation Medium

BEGM supplemented with 10% (v/v) DMSO and 30% (v/v) fetal bovine serum.

Store in liquid nitrogen vapor. Avoid immersing vials into liquid nitrogen.

Related Products

- Trypsin-EDTA Solution, ATCC® catalog no. 30-2101
- Cell culture tested DMSO, ATCC® catalog no. 4-X
- Erythrosin B vital stain solution, ATCC® catalog no. 30-2404
- Fetal Bovine Serum, ATCC® catalog no. 30-2020
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ATCC® catalog no. 30-2200

References

1. Halbert C.L. et al. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65: 473-478, 1991. PubMed: 1845902
2. Kiyono T. et al. Both Rb/p16 INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84-88,1998. PubMed: 9817205
3. Zabner J. et al. Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am.J. Physiol. Lung Cellular and Molecular Physiology.* 284: L844. L854, 2003. PubMed: 12676769
4. Bodnar A.G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349): 349-352, 1998. PubMed: 9454332

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.



Product Information Sheet for ATCC® CRL-4011™

5. Caputo JL. Biosafety procedures in cell culture. J. Tissue Culture Methods 11: 223-227, 1988.
6. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th edition. New York: Wiley Liss; 2000. For more information on enzymatic dissociation and subculturing of cell lines see Chapter 12. Available as ATCC® catalog no. 30-3001.

(Additional references may be available in the catalog description at www.atcc.org.)

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material (6). Laboratory safety is discussed in the following publication: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1999. The entire text is available online at: www.cdc.gov/od/ohs/biosafety/bmbi4/bmbi4/bmbi4toc.htm.

ATCC assigns a biosafety level (BSL) to each cell line for purposes of packaging for safe shipment. We recommend handling all cell lines under BSL 2 practices, even those we classify under BSL 1. Cell lines derived from primate lymphoid tissue may fall under the regulations of 29 CFR 1910.1310 (Bloodborne Pathogens).

ATCC Warranty

The viability of ATCC products is warranted for 30 days from the date of shipment. If you feel there is a problem with this product, contact Technical Services by phone at 800-638-6597 or 703-365-2700 or by e-mail at tech@atcc.org. Or you may contact your local distributor.

Use Restrictions

These cells are provided under a restricted use license and are claimed under U.S. Patent Nos. 6,261,836 and 6,337,200, other pending patent applications, and foreign counterparts thereof. The material may be used only by recipient scientist or those under his or her direct supervision and only for internal research and evaluation purposes in the Field of Use as defined in the Addendum to ATCC's Material Transfer Agreement signed by the recipient scientist and the recipient organization (collectively the "Purchaser"). Any commercial use in the Field will require a license from ATCC, including use under funding from a commercial organization.

Purchaser may not make, commercialize, sell, offer for sale or transfer to any third party the TERT gene, TERT-immortalized cell lines, components thereof, or reagents, including, but not limited to nucleic acids, plasmids, vectors, receptors, promoters, animals, chemical entities, pharmaceuticals, and other products and agents, which incorporate the TERT gene or protein or fragment thereof.

Any use, including the use for internal research and evaluation, outside the defined Field of Use, will require a

license from ATCC and the Geron Corporation. For more information on the ATCC license, please contact ATCC's Office of IP and Asset Management at 703-365-2700 or licensing@atcc.org. For more information on the Geron license, please contact the Geron Corporation, Attention: Director, Corporate Development, at tel. 650-473-7700, fax: 650-473-7701 or e-mail to corpdev@geron.com.

Disclaimers

This product is intended for research purposes only. It is not intended for human, clinical, or diagnostic use.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

See the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

© ATCC 2010. All rights reserved.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

05/10

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org
Or contact your local distributor.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka